RÉPUBLIQUE FRANÇAISE
MINISTÈRE DE L'AGRICULTURE

ANNALES DE L'INSTITUT NATIONAL
DE LA
RECHERCHE AGRONOMIQUE

SÉRIE E

ANNALES
DE TECHNOLOGIE AGRICOLE

CONSERVATION ET TRANSFORMATION
DES PRODUITS AGRICOLES

Année 1959

INSTITUT NATIONAL DE LA RECHERCHE AGRONOMIQUE
7, rue Keppler – Paris

RECHERCHES SUR LA RÉACTION DE MAILLARD

PAR

L. PETIT

Laboratoire de Biochimie et Physico-chimie
des Céréales et de leurs dérivés, Paris

PLAN DU MÉMOIRE

Introduction.

A. — Étude du premier stade de la réaction.

I. — Recherche de méthodes de dosage des constituants :
- 1° Glucose.
- 2° Glycocolle.
- 3° N-glucoside et isomère.
- 4° Substances indéterminées.

II. — Évolution du N-glucoside et du glycocolle.

B. — Étude du deuxième stade de la réaction.

I. — Isolement de « 296 ». Propriétés.
- 1° Méthode d'isolement. Analyse.
- 2° Propriétés physico-chimiques.
- 3° Hypothèses sur sa structure, son origine et son rôle.
- 4° Conditions d'accumulation.

II. — Examen général de l'absorption ultra-violette.
- 1° Réaction glucose-glycocolle dans différentes conditions.
- 2° Réaction entre sucres et amino-acides divers :
  - *a*) Glycocolle et différents sucres.
  - *b*) Glucose et différents amino-acides.
- 3° Réaction entre gluten et sucres.
- 4° Pigments de la croûte de pain.
- 5° Comparaison avec les produits de dégradation thermique des sucres.

C. — Étude de l'inhibition par le bisulfite.

I. — Réaction de Maillard en présence de bisulfite.

II. — Recherches sur « 288 ».

Conclusion.

INTRODUCTION

La réaction de Maillard prend naissance chaque fois que des protides ou des acides aminés sont chauffés en présence de sucres réducteurs, ou même sont simplement maintenus en leur présence à température ordinaire pendant des temps suffisamment longs. Elle est donc d'une très grande généralité et peut intervenir à des degrés divers, en laboratoire comme en usine, au cours de toutes les opérations de chauffage ou de stockage de matériel biologique. Le terme ultime est constitué par des pigments, solubles d'abord puis insolubles dans les derniers stades. Outre l'intérêt que peut offrir l'étude du mécanisme physico-chimique d'une réaction en grande partie encore inconnue, les recherches sur la réaction de Maillard présentent une importance certaine des points de vue technologique et nutritionnel.

En technologie, elle peut être tenue pour responsable, au moins en partie, des modifications de coloration, d'arôme et de caractères organoleptiques survenant à différents stades de la préparation ou du stockage de nombreuses substances alimentaires : jus de fruits, produits sucrés, (sirop de sucre, mélasses), malts et bières, poudres de lait et d'œufs, viandes et poissons séchés, pain (croûte) biscuits et pains d'épices. Elle est également à l'origine, là aussi en partie au moins, de l'évolution des qualités technologiques des blés et des farines au cours de leur stockage et des phénomènes responsables de la maturation des pâtes de pain d'épices.

Peu de choses sont actuellement connues sur ses répercussions dans le domaine de la nutrition. Il semble certain qu'elle se traduit par une diminution de la valeur alimentaire des protides pour les organismes supérieurs, du fait de la destruction d'acides aminés (lysine et tryptophane, en particulier) ou de la formation de complexes glucides-protides résistant aux hydrolyses enzymatiques par suite du blocage des groupes spécifiques sur lesquels se produit la fixation ou l'attaque de l'enzyme. Les microorganismes par contre paraissent capables d'effectuer ces hydrolyses, et c'est là un phénomène qui peut affecter la signification de dosages microbiologiques d'amino-acides. Dans certains cas même les produits de la réaction de Maillard ont été signalés comme susceptibles de jouer un rôle de facteur de croissance, en particulier vis-à-vis de certains agents pathogènes.

Pendant longtemps cette réaction a surtout fait l'objet de travaux technologiques ayant pour but d'éviter, ou, plus rarement de favoriser

le brunissement, l'apparition ou l'inhibition de la coloration étant l'unique préoccupation. Cependant depuis une dizaine d'années surtout, le mécanisme de la réaction a été étudié en lui-même et on s'est préoccupé de mettre en évidence la nature des corps intermédiaires entre amino-acides et sucres initiaux d'une part et pigments colloïdaux obtenus finalement d'autre part. Trois mises au point principales accompagnées de revues bibliographiques permettent de prendre une vue d'ensemble des travaux effectués depuis 1912 sur cette question : celle de ENDERS (1) en 1938, celle de DANEHY et PIGMAN (2) en 1951, enfin très complète, celle de HODGE en 1953. Les publications de CREMER et MENDEN (4) mettent spécialement l'accent sur les propriétés nutritionnelles des produits de la réaction de Maillard.

Le schéma général de la réaction peut s'exprimer ainsi (HODGE) : dans une première étape, donnant des composés non-absorbants dans le visible et le proche U-V, sucre et amino-acide réagissent pour donner un composé de condensation avec élimination d'eau : N-glycoside ou son produit de réarrangement de AMADORI, isolés et identifiés de différents côtés. Dans un second stade, donnant des produits caractérisés par une absorption ultra-violette, il y a déshydratation et scission de la molécule de sucre ; c'est à ce stade qu'il faut rechercher les composés carbonylés réducteurs caractéristiques de la réaction de Maillard. Enfin, il y aurait en troisième lieu condensation de ces restes glucidiques entre eux et avec l'amino-acide pour conduire aux polymères fortement colorés dans le visible puis aux mélanoïdines insolubles. En réalité ces trois étapes chevauchent les unes sur les autres et en général leurs constituants coexistent.

Les résultats ainsi résumés appellent quelques remarques :

1° Nombreuses sont les données obtenues par les méthodes de la chimie organique dans des milieux et avec des substances fort éloignées des conditions biologiques.

2° Très peu ou sinon aucun travail quantitatif n'a été effectué permettant de classer les différents types de réaction du point de vue de leur importance relative.

3° Ils concernent surtout la dégradation du glucide et n'éclairent que fort peu celle de l'amino-acide, en particulier son rôle d'accélérateur du brunissement des composés furfuryliques, la nature des liaisons de l'azote aux dérivés glucidiques, les propriétés des composés résultants.

Le travail dont les résultats seront rapportés ici présente les caractéristiques suivantes :

— Il a été effectué sur des préparations de mélanoïdines obtenues par chauffage de mélanges synthétiques de sucres et d'amino-acides.

— Il porte exclusivement sur les composés intermédiaires de la réaction de brunissement dont les propriétés physiologiques ou le rôle

biologique sont sans doute plus importants que ceux des pigments terminaux.

— Il a eu pour but de rechercher des techniques d'identification et d'isolement de ces composés et, si possible, des méthodes de dosage. On s'est également préoccupé de dégager des caractères spécifiques de cette réaction qui permettraient de la différencier, dans les milieux naturels, des autres types de brunissement (caramélisation ou brunissement oxydasique).

Les recherches ont été poussées dans trois directions :

A. — **Étude du premier stade de la réaction** : recherche de méthodes de dosage du sucre et de l'amino-acide ; mise au point d'une méthode de dosage du N-glycoside.

B. — **Étude du deuxième stade de la réaction** : fractionnement des produits responsables de l'absorption ultraviolette dans les milieux synthétiques et naturels. Isolement et dosage d'un nouvel intermédiaire du brunissement. Étude de sa constitution et de ses propriétés.

C. — **Étude de l'inhibition de la réaction** par le bisulfite avec l'hypothèse que cette inhibition se situe à un niveau intermédiaire entre le 1er et le 2e stade.

Il a été en général effectué en profondeur sur des mélanges de glucose et de glycocolle dans différentes conditions de réaction (température, temps, hydratation, pH). Dans la mesure du possible les méthodes qui se sont alors montrées efficaces ont été testées vis-à-vis de milieux naturels.

Dans le but de présenter une vue d'ensemble de ces travaux, certains résultats qui ont déjà fait l'objet de publications seront rappelés ; par contre les détails expérimentaux ont été omis et seront donnés lors de publications ultérieures partielles.

A. — RECHERCHES RELATIVES AU PREMIER STADE DE LA RÉACTION

I. — Méthodes de dosage des constituants.

1° Dosage du Glucose.

Le dosage direct du glucose dans le milieu de réaction est entaché d'erreurs grossières en raison de la présence dans les préparations de mélanoïdines de composés réducteurs ou actifs sur la lumière polarisée. Nous avons montré (5) que la méthode de Blass, Machebœuf et Nunez (6) au phtalate acide d'aniline appliquée après chromatographie sur papier conduisait à des résultats cohérents. Mais par la suite ce réac-

tif s'est montré susceptible de donner des résultats difficilement reproductibles avec une bonne précision. Cherchant alors à utiliser les méthodes de dosage par réduction du cuivre (7), nous avons constaté que la chromatographie sur papier n'assure plus une purification suffisante ; il est nécessaire de la faire précéder d'une filtration sur échangeur de cations pour éliminer un composé fluorescent accompagnant le glucose sur les chromatogrammes (5) et capable d'interférer avec lui dans la réduction du cuivre alors qu'il était sans influence sur la réaction au phtalate d'aniline.

En plus de ces difficultés techniques, ce dosage correct du glucose en excès dans le milieu est encore compliqué par le fait qu'il semble que se poursuivent, même à température ambiante, des déplacements d'équilibre au sein de la préparation. En effet des dosages échelonnés au cours du temps ont conduit à des valeurs régulièrement variables. Dans ces conditions l'évaluation exact du glucose (avec une erreur inférieure à 10 p. 100) s'est avérée aléatoire et les dosages en série n'ont pu être réalisés.

Ces résultats ont été obtenus uniquement à partir de mélanoïdines de glucose et de glycocolle ; il est possible qu'il ne puissent être étendus à des produits provenant de la réaction de sucres et d'aminoacides différents.

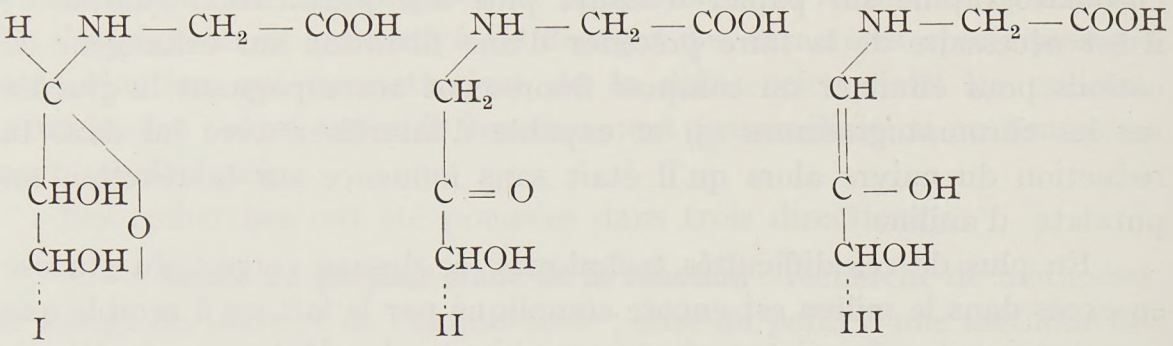
2° Dosage du Glycocolle.

Le dosage exact de l'aminoacide en excès par les méthodes habituelles conduit également à des résultats douteux : la formol titration est faussée par la présence de divers acides de pK variés ; la méthode de VAN SLYKE est inutilisable du fait que différents produits de la réaction sont désaminés au même titre que l'aminoacide ; enfin certains d'entre eux réagissent à la ninhydrine. Dans ces conditions nous avons essayé d'appliquer la méthode de WOÏWOD utilisant la formation de complexe de cuivre par l'amino-acide après séparation chromatographique. Les résultats obtenus (5) semblent satisfaisants, concordent avec les moyennes de dosage à la ninhydrine après chromatographie, et sont d'une reproductibilité de beaucoup supérieure. La même technique a d'ailleurs été utilisée de façon indépendante par TÄUFEL et IWAINSKY (8).

3° Dosage du N-carboxymethyl amino l. deoxy l. fructose.

On peut séparer par chromatographie sur papier un composé réagissant à la ninhydrine qui a d'abord été considéré comme le N-glycosylglycine (I) provenant de la condensation d'une molécule de glycocolle et d'une molécule de glucose avec élimination d'eau. Il semble actuellement (9) qu'il s'agisse plutôt de son produit de réarrangement de

Amadori (II) qui s'accumulerait dans le milieu de réaction sous sa forme énolique (III). Ce serait donc le N-carboxymethyl amino 1-deoxy 1-fructose (C. A. D. F.).



L'intérêt du recours aux complexes de cuivre réside surtout en ce qu'ils permettent un dosage exact et précis de cet intermédiaire qui représente le terme final du 1er stade de la réaction. Ce travail ayant déjà fait l'objet de deux publications (5-10) ne sera que brièvement résumé ici :

a) La quantité de cuivre complexée par des préparations de mélanoïdines de plus en plus pauvres en amino-acide étant croissante, on en déduit l'existence d'un ou de plusieurs constituants susceptibles de complexer le cuivre dans un rapport molaire plus important que l'amino-acide.

b) Un de ces constituants est le corps réagissant à la ninhydrine identifié comme étant le C. A. D. F. décrit ci-dessus. Ayant établi que dans le complexe de cuivre qu'il donne, le rapport molaire Cu/N est égal à 1, il est possible de calculer le nombre de molécules d'aminoacide engagées dans cette combinaison.

4° **Mise en évidence de constituants indéterminés.**

La somme des quantités de cuivre complexées par le glycocolle et le C. A. D. F. séparés par chromatographie sur papier est toujours inférieure à la quantité complexée par une prise égale de matériel non soumis à chromatographie, alors qu'aucune autre partie du chromatogramme ne donne lieu à la formation de complexes. Comme il a été vérifié que ce « déficit de bilan de cuivre » ne pouvait être attribué à une perte de glycocolle ou de C. A. D. F., on peut conclure qu'il existe dans les préparations de mélanoïdines une troisième classe de constituants capables de former des complexes et que ces constituants ou bien sont détruits au cours de la chromatographie ou bien, par suite d'une réaction avec les solvants, perdent leur faculté de complexer le cuivre. Or la seule action des solvants, sans séparation chromatographique, n'altère en rien les propriétés de complexation des mélanoïdines. Il s'agit donc plutôt de composés en équilibre soit avec les produits qui leur donnent naissance,

soit avec leurs produits de dégradation ; la chromatographie, en opérant la séparation des corps en équilibre, entraînerait un déplacement continuel de cet équilibre ayant pour conséquence la disparition totale (rétrogradation ou dégradation plus poussée) des composés initialement capables de complexer le cuivre.

Ces composés peuvent être ainsi dosés par le « défaut de bilan de cuivre », dont ils sont responsables et qui varie de façon cohérente et régulière en fonction du temps de réaction entre le glucose et le glycocolle. D'autre part le spectre visible de leurs complexes de cuivre a pu être obtenu par différence entre le spectre des complexes donnés par la mélanoïdine non soumise à chromatographie et la somme des spectres calculés des complexes du glycocolle et du C. A. D. F. On obtient ainsi, entre 800 et 400 mμ, un spectre continûment croissant, dont la pente s'accentue particulièrement au-dessous de 450 mμ. Un tel spectre diffère totalement de ceux des complexes de cuivre du glycocolle et du C. A. D. F. Le premier présente en effet un maximum à 635 mμ (11) ; le second, établi au cours de ce travail, a son maximum à 720 mμ et un minimum à 500 mμ.

II. — Évolution du N-glycoside au cours de la réaction glucose-glycocolle.

En possession de ces méthodes de dosage, nous avons suivi l'évolution des quantités de glycocolle et de C. A. D. F. en fonction du temps de réaction dans une zône de température allant de 60 à 90°C, dans des solutions initialement normales en glucose et en glycocolle, le pH prenant les valeurs imposées par l'évolution du système et se déplaçant donc vers la zône acide lorsqu'augmente la durée de la réaction.

Les courbes ci-jointes (fig. I *a*, *b*, *c*, *d*) représentent en fonction du temps l'accumulation du C. A. D. F. et l'évolution de l'azote « dégradé » (= ΔN), ce terme désignant le N engagé dans d'autres molécules que celles du glycocolle initial et du C. A. D. F. accumulé : $\Delta N = N_0 - (N_G + N_{C.A.D.F})$.

Quelle que soit la température, les phénomènes évoluent de façon analogue : pendant une première phase de la réaction, jusqu'à un temps critique T_c, on assiste à une accumulation assez rapide du C. A. D. F. puis brusquement la vitesse d'accumulation diminue. Inversement, pendant un certain temps seuil T_s, $\Delta N = 0$. Donc pendant ce temps T_s la molécule d'amino-acide est soit libre, soit engagée dans la molécule du C. A. D. F., c'est-à-dire que les pigments formés pendant cette période sont essentiellement d'origine glucidique. Il s'agit alors d'une dégradation catalytique, le brunissement étant nul en l'absence d'amino-acide. En réalité, la suite du travail (étude de l'absorption U-V) a montré que

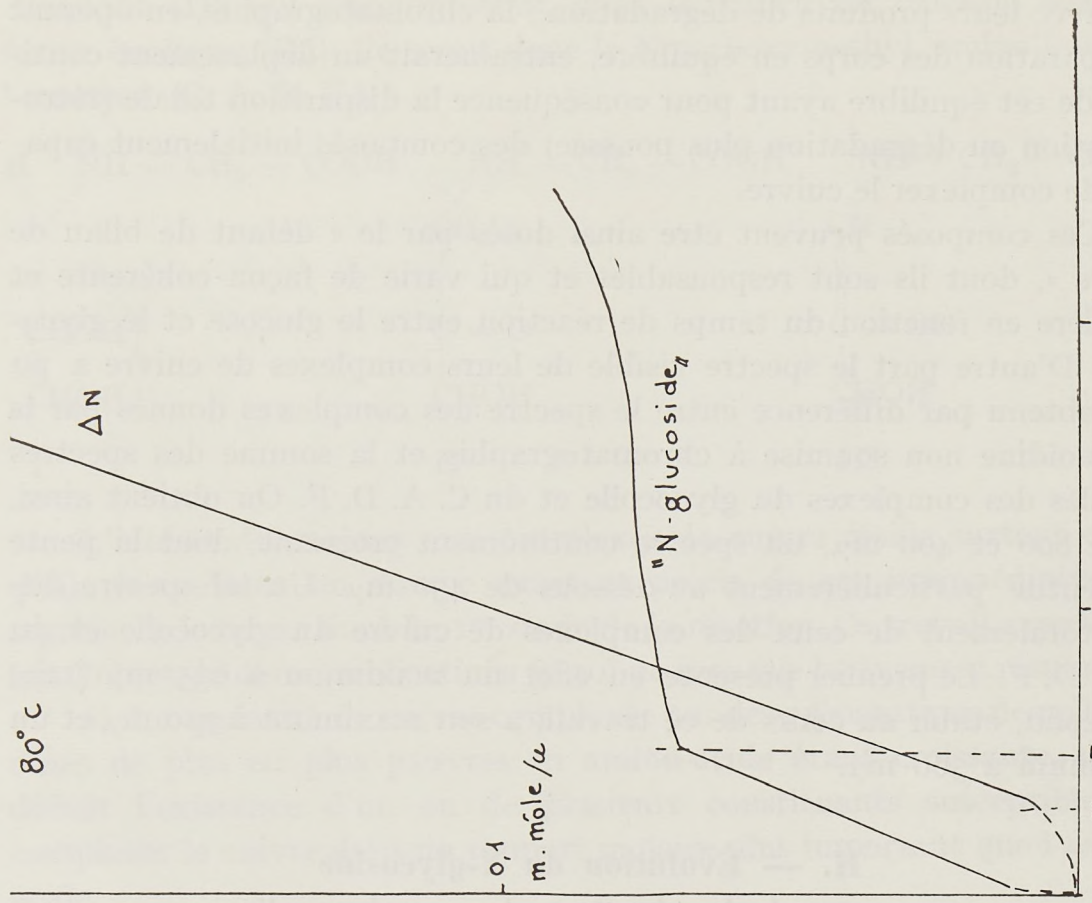

80° C
ΔN
"N-glucoside"
0,1 m. môle/cc
T_s
T_c
50h
100h

FIG. I *b*.

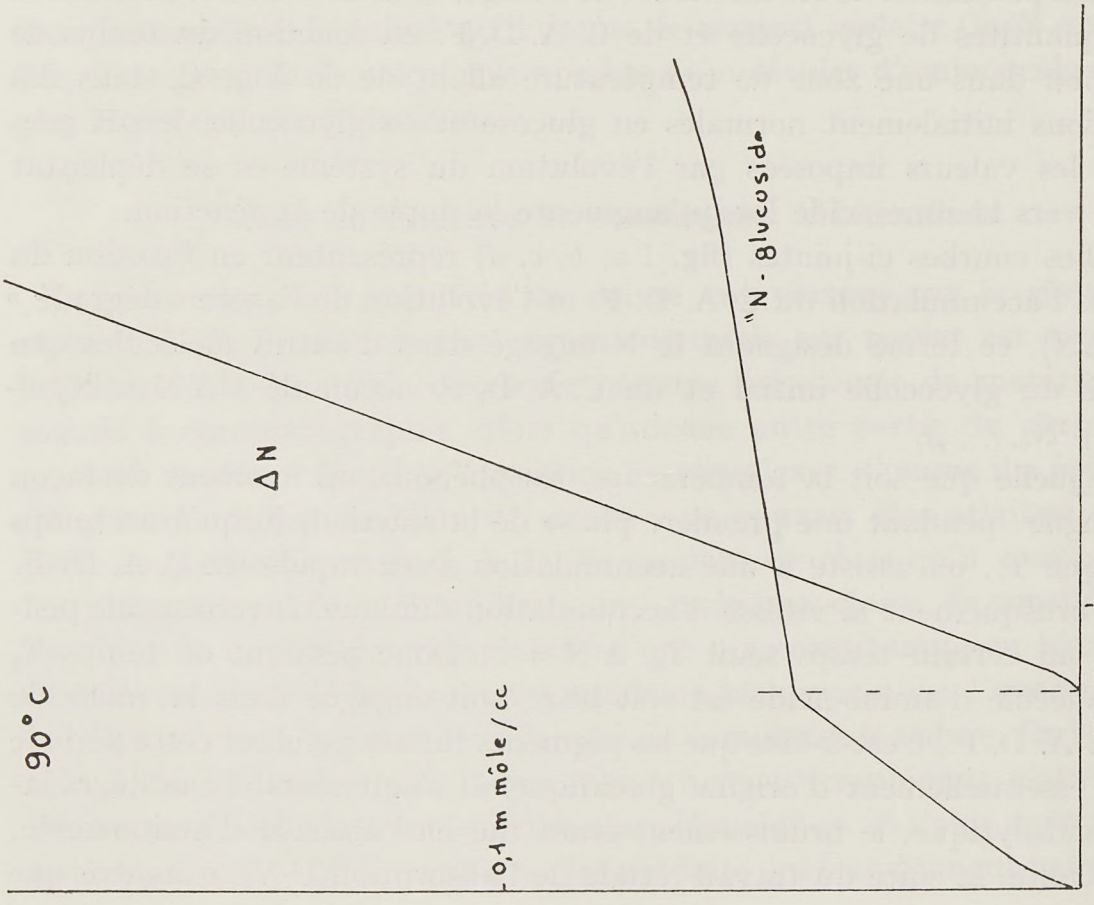

90° C
ΔN
"N-glucoside"
0,1 m môle/cc
$T_c = T_s$
10 h

FIG. I *a*.

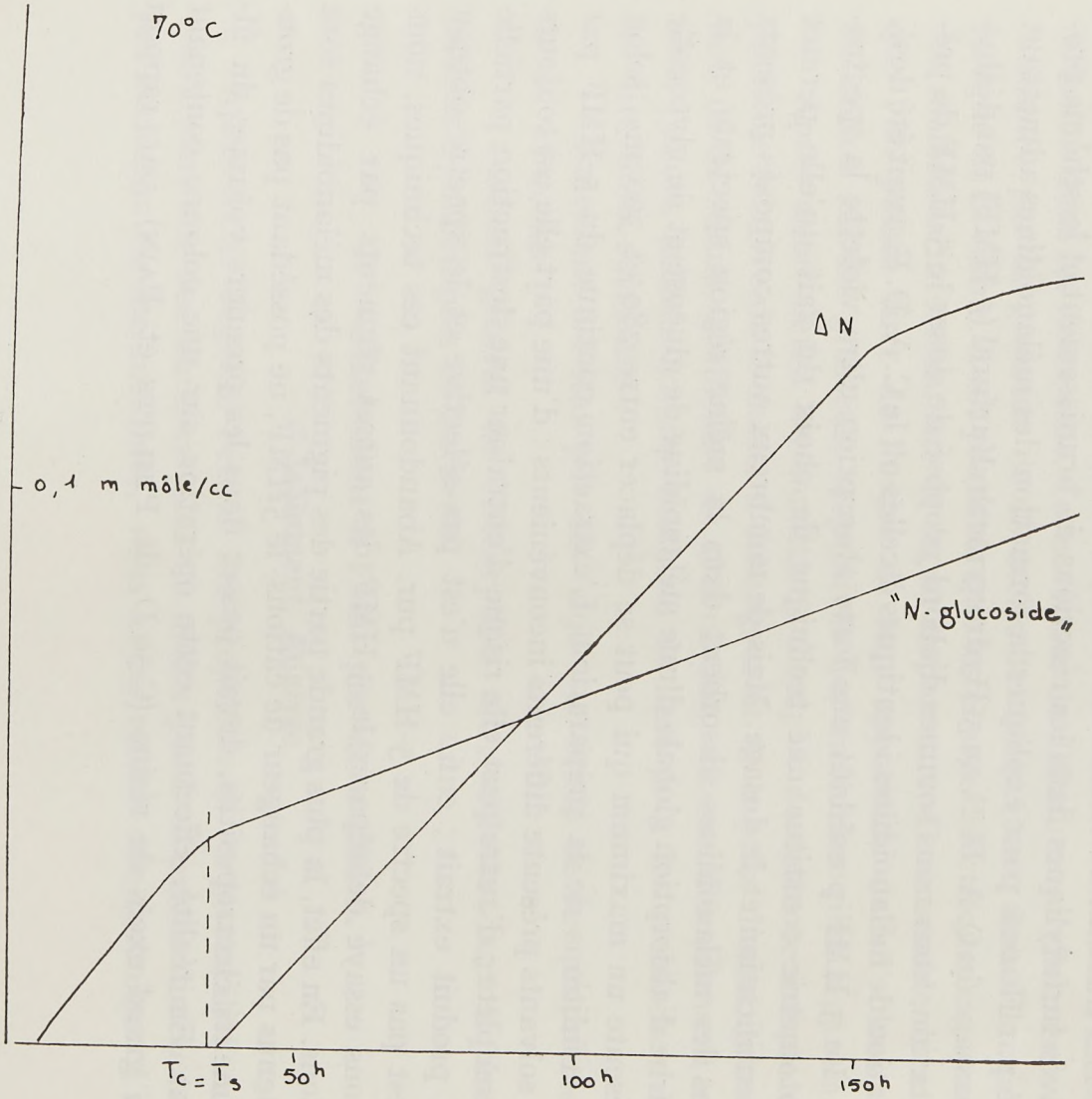

70° C
ΔN
0,1 m môle/cc
"N-glucoside"
$T_c = T_s$
50 h
100 h
150 h

FIG. I *c*.

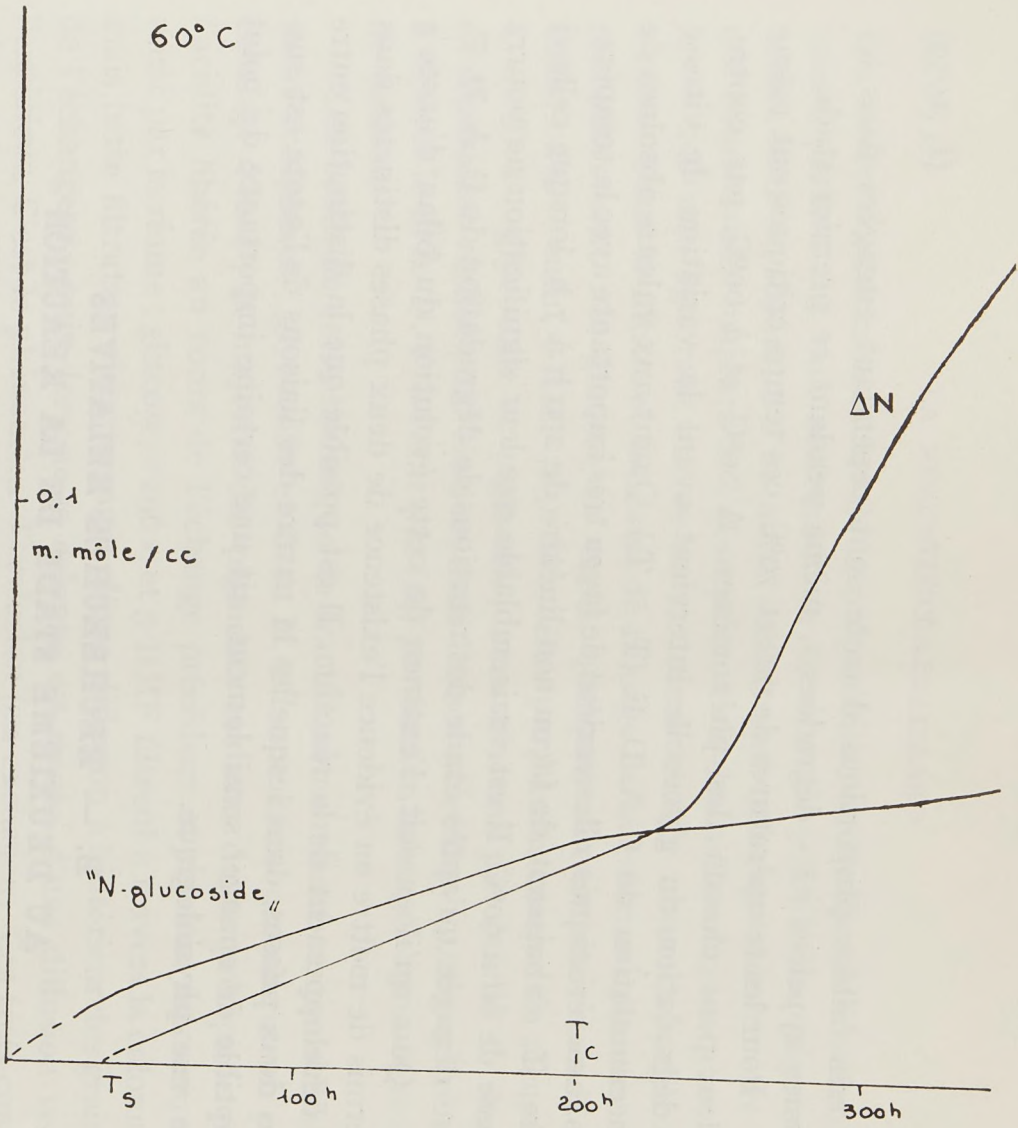

60° C
ΔN
0,1
m. môle / cc
"N-glucoside"
T_c
T_s
100 h
200 h
300 h

FIG. I *d*.

de très faibles proportions d'azote sont cependant engagées dans les formes appelées ici « dégradées », même pendant ce premier stade.

Pour les températures de 90° et 70°C, ces temps critiques ont même valeur pour chacun des phénomènes. A 80°C et à 60°C par contre, la dégradation du glycocolle intervient avant la variation de vitesse d'accumulation du C. A. D. F. ($T_c > T_s$). Quant aux valeurs absolues de ces caractéristiques, elles varient de façon très importante avec la température, T_c s'abaissant de façon non linéaire de 200 h à 7 h, lorsque celle-ci passe de 60 à 90°C. Il est vraisemblable que leur signification ne pourra être dégagée qu'après étude des réactions de dégradation du C. A. D. F.

Quoi qu'il en soit, l'examen de cette évolution du bilan d'azote a permis de mettre en évidence l'existence de deux phases distinctes dans le développement de la réaction. Il est possible que la distinction entre ces deux phases, dans lesquelles la nature des liaisons de l'azote est susceptible de changer sensiblement, ait une certaine importance du point de vue physiologique.

B. — RECHERCHES RELATIVES AU DEUXIÈME STADE DE LA RÉACTION

Les travaux de Wolfrom et coll. (12) ayant montré l'importance des dérivés furfuryliques dans les réactions de brunissement et le schéma proposé par Hodge pour expliquer la formation des mélanoïdines admettant le passage du C. A. D. F. au 5-Hydroxymethylfurfural (5-HMF) par déshydratation, nous nous sommes d'abord proposé de doser le 5-HMF de préparation de mélanoïdines identiques à celles où le C. A. D. F. avait été dosé.

Le 5 HMF possédant une forte absorption ultra-violette la spectrophotometrie constitue une technique de choix du fait qu'elle permet l'identification et le dosage. Mais de nombreux autres composés présents dans les mélanoïdines absorbent dans la même région spectrale et la courbe d'absorption globale d'une mélanoïdine de glucose et de glycocolle présente un maximum qui peut se déplacer entre 280 et 300 mμ. selon les conditions de la préparation. L'extraction continue du 5-HMF par les solvants présente différents inconvénients : d'une part elle est toujours incomplète ; d'autre part elle risque d'entraîner une destruction partielle du produit extrait ; enfin elle n'est pas sélective et le spectre obtenu n'est pas un spectre de 5-HMF pur. Abandonnant ces techniques, nous avons essayé de séparer le 5-HMF des autres pigments par échange d'ions. En effet, la plus grande partie des pigments des mélanoïdines sont retenus par un échangeur de cations, le 5HMF, ne possédant pas de groupements électropositifs, devait passer dans les premiers volumes du filtrat. En réalité, effectuant cette opération sur une colonne contenant un grand excès de résine (C 50 D, de Philipps et Pain) par rapport

aux substances échangeables de la préparation, on réalise un fractionnement, permettant non seulement de séparer le 5-HMF des pigments bruns, mais le séparant d'un autre constituant qui s'est montré être un des responsables majeurs de l'absorption U-V des mélanoïdines, avec un $\lambda_M = 296$ mμ. Ignorant encore sa structure exacte nous l'appellerons « 296 ». Dans le filtrat et les eaux de rinçage de la colonne apparaissent successivement : le glucose en excès, quelques constituants non identifiés, « 296 «, enfin 5-HMF (13). Si on élue par l'ammoniaque on récupère C. A. D. F., glycocolle et pigments; nous n'avons pas étudié le degré de séparation réalisé par l'élution, mais DUBOURG et DEVILLERS ont réussi à séparer le C. A. D. F. à l'état pur (14) par élution ménagée après échange de cations.

Les bases de cette technique de fractionnement sont vraisemblablement complexes : glycocolle et C. A. D. F. sont fixés certainement par échange d'ions ; la majorité des pigments est sans doute précipitée par l'acidité libérée au cours de l'échange précédent et retenue mécaniquement par la résine ; glucose, « 296 », et 5-HMF filtrent à travers la colonne, mais cette filtration s'accompagne d'une diffusion à l'intérieur des grains de l'échangeur ; puis, lorsque la colonne est rincée, d'une diffusion vers l'extérieur. C'est le phénomène d'ecclusion (ou exclusion). Ces trois constituants se trouvent finalement séparés en fonction de leur vitesse de diffusion dans les deux sens. Cette vitesse de diffusion est elle-même conditionnée par la grosseur de la molécule. Mais étant donné la nature ionique de la résine, il est probable que les charges électriques éventuelles des molécules interviennent de façon importante. Il ne semble donc pas que l'on puisse tirer de l'ordre de leur apparition dans l'effluent une indication sur les grosseurs respectives des molécules ainsi séparées.

Après avoir défini les conditions d'emploi de cette technique (importance relative de la masse d'échangeur et de la prise d'essai, granulation de la résine, coefficient de réticulation, vitesse d'écoulement etc.) nous l'avons utilisée comme méthode de base pour les recherches dans les directions suivantes :

— isolement à l'état pur de « 296 » et étude de ses propriétés et de sa structure ;

— examen général de l'absorption ultra-violette dans différents milieux synthétiques et naturels.

I. — Isolement à l'état pur de « 296 ».

1° Isolement. Analyse.

Après avoir dégrossi l'étude des propriétés et de la stabilité de ce constituant sur des fractions plus ou moins pures obtenues directement par ecclusion de mélanoïdines, nous avons retenu une technique d'iso-

lement (schématisée sur le tableau II) qui conduit à un corps de composition chimique et de propriétés physico-chimiques constantes. La forme acide (296 H) est très hygroscopique et brunit rapidement, seule la forme sel de calcium (296 Ca) est stable et a été utilisée pour les déterminations à l'état sec.

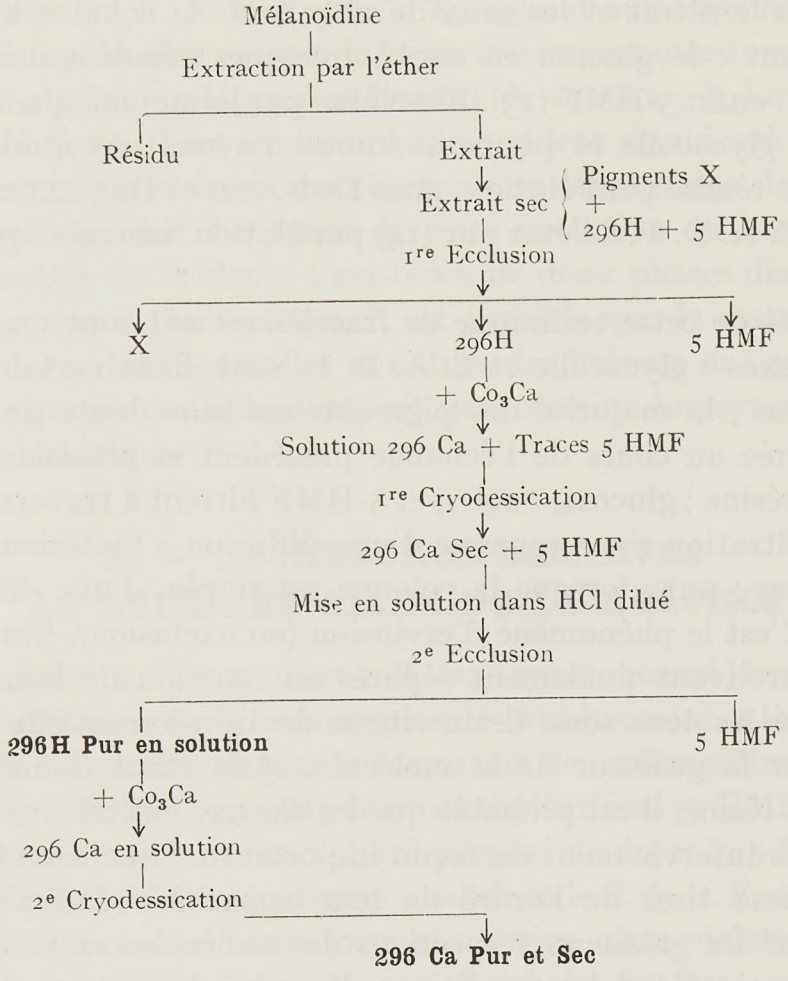


FIG. II. — Schéma de la préparation de « 296 »

L'analyse élémentaire donne la composition suivante :

C = 42,03 p. 100 H = 4,13 p. 100, O = 37,32 p. 100,
N = 4,32 p. 100 Ca = 12,20 p. 100.

Sur la base d'un minimum d'un atome de N par molécule on calcule le poids moléculaire M = 324. Sur la base d'un atome de Ca par molécule (cas d'un diacide) : M = 328. Le poids moléculaire peut être également déterminé en combinant les mesures d'acidimétrie et d'absorption U-V de la forme acide et de la forme sel. On trouve par cette méthode M = 329. Les trois mesures sont en bonne concordance, la moyenne étant M = 327.

Dans ces conditions la formule brute s'écrit pour :

296-Ca = $C_{11}H_{13}O_8NCa$ M = 327
296-H = $C_{11}H_{15}O_8N$

on déduit de là que le nombre total de doubles liaisons et de cycles doit être égal à 5.

2° Propriétés physico-chimiques.

Spectrophotométrie. — Les deux formes, acide et sel, possèdent le même spectre U-V, qualitativement et quantitativement (fig. III) présentant en solution aqueuse un maximum accentué à 296 mμ, un contre fort entre 255 et 275 mμ, un minimum à 225 mμ. Ces caractéristiques spectrales laissent penser que ce « 296 » est identique au composé « 5 » séparé par CHICHESTER, STADTMAN et MCKINNEY (15) par chromatographie sur papier. Au maximum d'absorption,

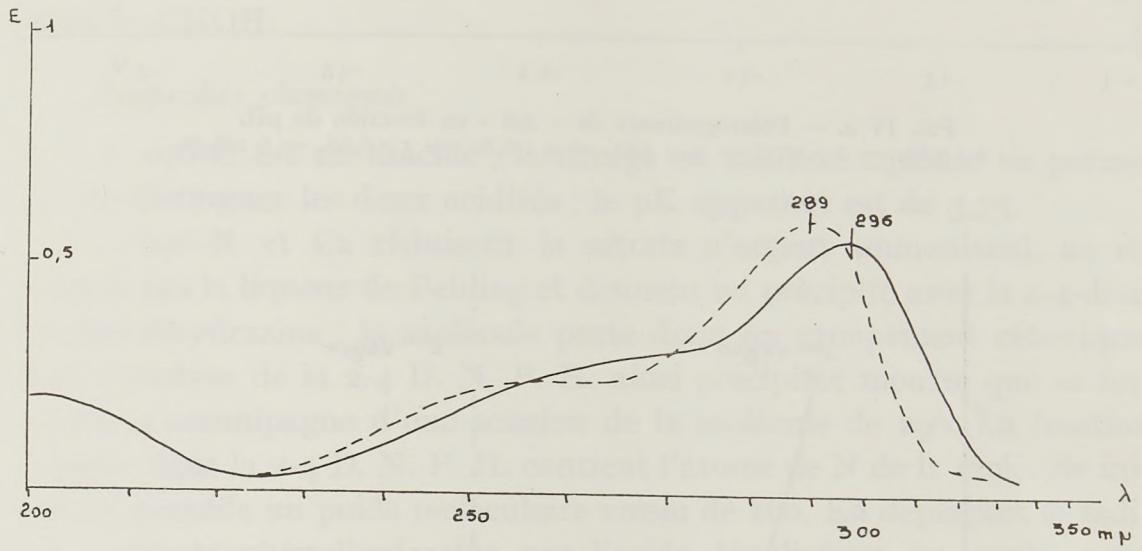


FIG. III. — Spectres U-V de « 296 » en solution
-------- éthérée ——— aqueuse.

E_M = 17.760 ; cette valeur élevée conduit à penser que l'absorption est due non à un groupement fonctionnel unique, mais à une résonance entre chromophores conjugués.

En solution éthérée, 296-H et 296-Ca montrent encore un spectre identique, mais quelque peu différent de celui décrit en solution aqueuse. Le spectre subit un déplacement général vers les courtes longueurs d'onde (λ_{Max} = 289 mμ, λ_{Min} = 222 mμ) et le contrefort est nettement plus accentué ; cette dernière particularité pourrait indiquer que l'absorption dans cette zône est en relation avec les groupes ionisables de la molécule.

Enfin, nous avons déterminé, pour des solutions aqueuses, les caractéristiques spectrales permettant d'appliquer au mieux la méthode de correction de MORTON et STUBBS au dosage de ce corps dans les effluents d'ecclusion compte-tenu des perturbations spectrales rencontrées dans ces milieux. Il est alors possible de doser ce 296-H dans les mélanoïdines et d'étudier exactement les conditions de formation et d'accumulation.

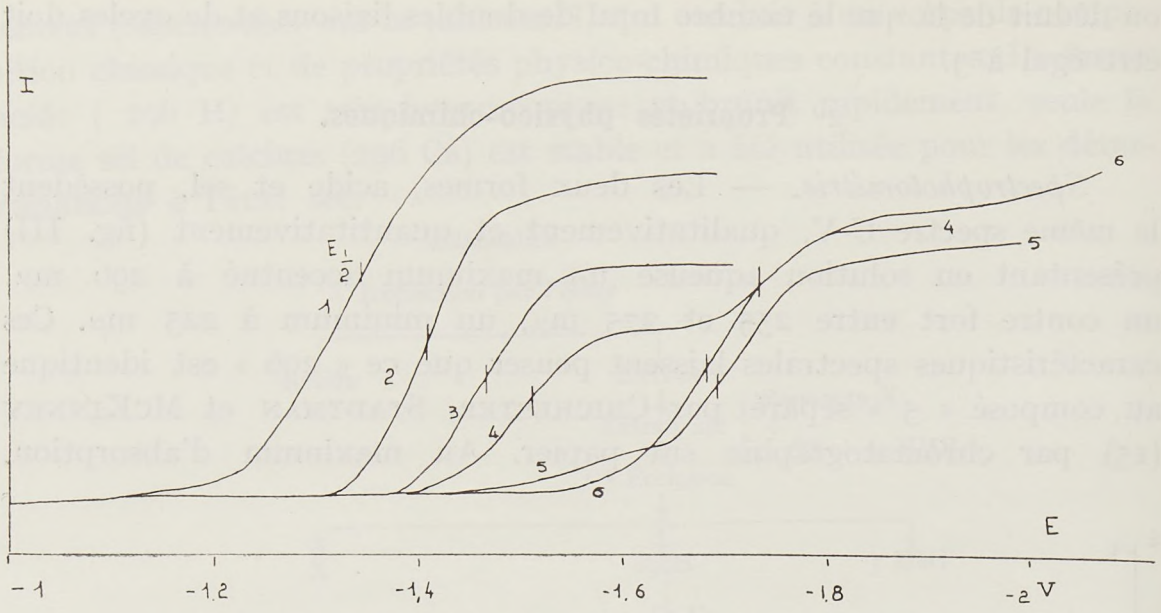


FIG. IV *a*. — Polarogrammes de « 296 » en fonction du pH.
1 : 3,83. — 2 : 4,77. — 5,. : 3,67. — 4 : 6,80. — 5 : 6,68. — 6 : 8,40.

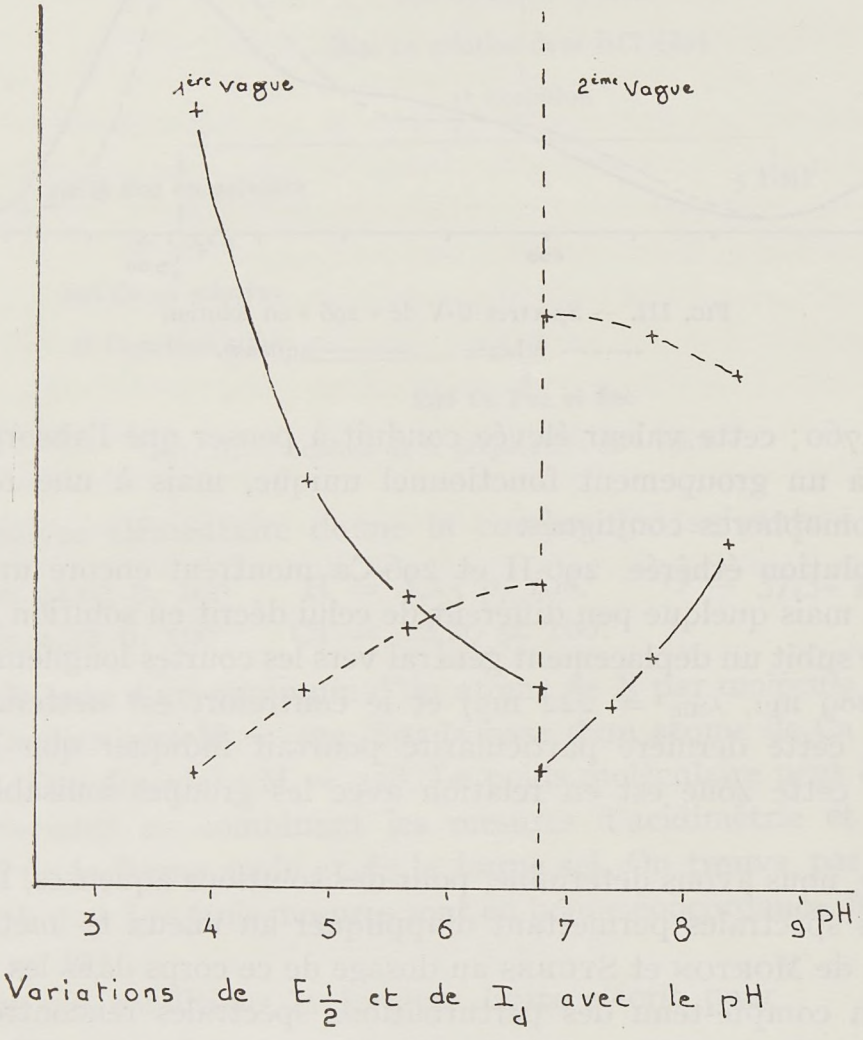


FIG. IV *b*. — Variation de $E_{1/2}$ et de I_d avec le pH
—— $E_{1/2}$ ------ I_d.

Polarographie. — Le comportement de 296-H ou -Ca à l'électrode à gouttes de Hg dépend du pH du milieu (fig. IV). Etant donné l'état actuel des données théoriques sur la polarographie, il n'est pas possible de tirer de ces résultats des indications certaines sur la structure du composé. On peut noter pourtant que ce comportement est voisin de celui de l'acide pyruvique et qu'en conséquence une structure d'acide cétonique est vraisemblable. On peut également utiliser la polarographie comme méthode de dosage, mais les résultats sont certainement moins exacts que ceux donnés par la spectrophotométrie.

Polarimétrie. — Aucun pouvoir rotatoire n'est observable. Etant donné les concentrations réalisées cela signifie que si celui-ci existe $[\alpha] < \pm 15^{\circ}$; on ne peut de ce fait conclure à l'absence de groupement — CHOH.

Propriétés chimiques :

— 296-H est un diacide ; le titrage en solution aqueuse ne permet pas de distinguer les deux acidités ; le pK apparent est de 3,75.

— 296-H et Ca réduisent le nitrate d'argent ammoniacal, ne réduisent pas la liqueur de Fehling et donnent un précipité avec la 2-4-dinitrophénylhydrazine ; la molécule porte donc un groupement cétonique. Mais l'analyse de la 2-4 D. N. P. H. ainsi précipitée montre que sa formation s'accompagne d'une scission de la molécule de 296. La fraction engagée dans la 2-4 D. N. P. H. contient l'atome de N de la molécule initiale et possède un poids moléculaire voisin de 160. En déplaçant le radical 2-4dinotrophénylhydrazine par l'acide lévulinique en excès pour régénérer le résidu carbonylé (16), on ne retrouve pas les propriétés spectrales du 296 initial. La fraction non carbonylée de la molécule est, elle aussi, dépourvue d'absorption U-V.

— Après oxydation permanganique, il y a apparition d'un aldéhyde. La molécule porte donc un ou plusieurs groupements alcools primaires. L'indice d'acétyle dose 1 groupe OH. Il s'agit donc de 1-CH_2OH.

D'autre part, la molécule n'est pas touchée par l'oxydation périodique ; les fonctions acides, alcool et cétone ne sont donc pas en α les unes des autres.

— 296-H chauffé en solution aqueuse ou 296-Ca chauffé en milieu acide donnent naissance à une coloration rouge, suivie de la formation d'un précipité violacé ; les corps qui se forment ainsi n'absorbent pas ou n'absorbent que faiblement dans l'U-V. En particulier, il n'y a pas formation de 5-HMF.

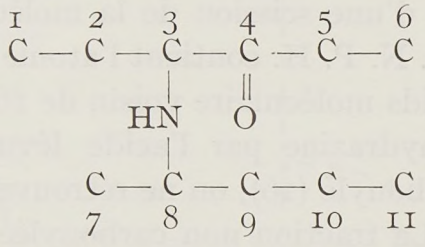
— Enfin, mis en contact d'une résine échangeuse d'anions possédant des groupes ammonium quaternaire, 296-H est immédiatement fixé et provoque un brunissement intense de la résine. La réaction est irréversible ; aucun traitement acide ou alcalin ne parvient à régénérer l'échangeur.

3° Hypothèse sur sa structure, son origine et son rôle.

La formule globale en C_{11} obtenue à partir de molécule de sucre en C_6 et de glycocolle en C_2 indique que le corps en question résulte nécessairement d'une réaction entre fragments des molécules initiales.

Il est vraisemblable que l'amino-acide lui-même a été préalablement décarboxylé et intervient au plus avec un groupe CH_3 : le composé « 5 » de CHICHESTER et coll. (14) ne possède par le -COOH de l'amino-acide initial. Dans ce cas, interviendraient deux restes glucidiques en C_5, ayant perdu chacun un C. Mais nous pensons que le premier stade de la formation de ce « 296 » serait plutôt une réaction de transamination entre une molécule en C_6 α-dicarbonylée et une molécule de glycocolle, celui-ci perdant son CO_2 et son CH_2 transformé en formaldéhyde (réaction de STRECKER) ; le deuxième stade pourrait être une copulation de l'amine cétonique ainsi formée avec un reste glucidique en C_5, aldéhydique ou cétonique, qui pourrait éventuellement se former par dégradation du 5-HMF, selon un schéma analogue à celui admis pour expliquer la formation d'acide lévulinique (en C_5) à partir du 5-HMF (en C_6).

La molécule de 296 serait alors composée de deux chaînes carbonées l'une en C_5, l'autre en C_6, reliées par un pont -NH, d'après le schéma suivant :



Dans cette hypothèse, trois des quatre bouts de chaîne seraient occupés par les deux fonctions acides (en 6 et 11) et la fonction alcool primaire (1 ou 7). Pour satisfaire à la fois au nombre d'atomes oxygène (= 8) et au nombre de doubles liaisons ou de cycles (= 5) on est alors conduit à envisager l'existence de 2 ponts oxydiques, entre 2 et 5, 7 et 10 par exemple, ou encore d'un pont oxydique et d'une fonction époxy entre 9 et 10.

Des essais faits en solutions pures de 296 et de glucose ou de glycocolle, il ressort qu'il *contribue au brunissement par action sur l'amino-acide*. 296-H et 296-Ca provoquant des effets identiques du point de vue de la coloration et de la destruction du glycocolle, il est vraisemblable que les fonctions acides n'interviennent pas dans ce processus. Il est probable que c'est la fonction cétonique qui réagit avec la fonction aminée, mais on peut également envisager l'hypothèse où ce seraient les produits de la dégradation thermique de 296 qui interviendraient dans le mécanisme du brunissement.

4° Conditions d'accumulation.

L'accumulation de 296 dans les préparations équimoléculaires en constituants initiaux est favorisée par l'élévation de la température de réaction et la neutralité du milieu. Les courbes V*a* représentent le phénomène pour des milieux pâteux dont le pH suit son évolution normale.

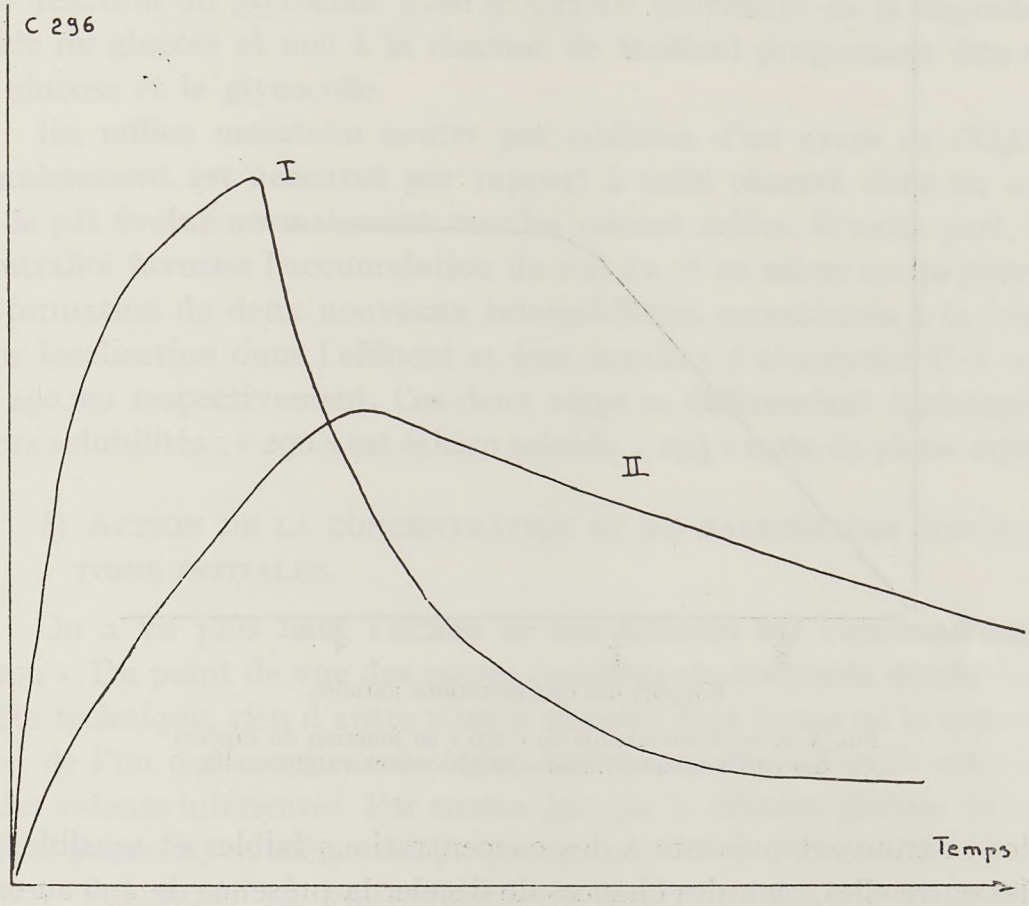


FIG. V *a*. — Évolution de la concentration en « 296 » au cours de la réaction en milieu aqueux 1 à 90°C 2 à 80°C.

La chute de concentration intervient juste avant la précipitation de la mélanoïdine insoluble. L'influence de la concentration est complexe :

— Si, les constituants initiaux étant en proportions équimoléculaires, cette concentration connue est inférieure à N/2, on ne trouve pas 296 dans la préparation.

— Si, par contre, on choisit une concentration N/1 soit en glucose, soit en glycocolle et que l'on donne à l'autre des valeurs inférieures (N/2, N/5), 296 s'accumule dans le milieu à une allure qui ne dépend pas de la nature du constituant à concentration initiale élevée (courbe V*b*). Glucose et glycocolle jouent des rôles exactement symétriques ; il suffit que la concentration de l'un soit initialement élevée pour que se forme 296.

Ces essais n'ont toutefois été effectués que pour une seule température (90°C) et une seule durée de réaction (24 h). Leur but était de voir si cette

formation de 296 présentait un caractère assez général pour pouvoir être considérée comme un indice valable de la réaction de Maillard dans des milieux naturels de teneurs variées en protides et en glucides. Ces premiers résultats partiels montrent donc que sauf le cas où sucres et amino-

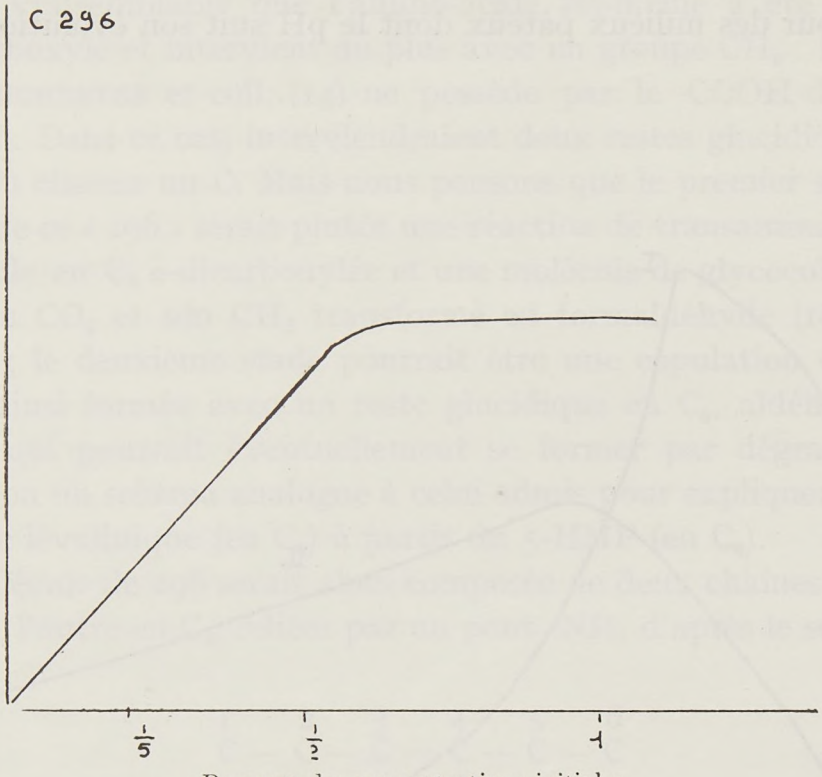


FIG. V *b*. — Accumulation de « 296 » en fonction du rapport des concentrations initiales en glucose et en glycocolle.

acides se trouvent présents à des concentrations faibles et sensiblement égales entre elles, on a des chances de déceler la présence de 296 au cours d'une réaction de Maillard assez poussée.

II. — Examen général de l'absorption U-V de la réaction sucres-amino-acides.

Toujours dans le même but d'étude du mécanisme de la réaction et de sa détection dans les milieux naturels, et parallèlement à cette étude approfondie d'un des intermédiaires de la chaîne des réactions glucose-glycocolle dans des conditions particulières, le problème a été élargi :

— En cherchant à déceler d'autres intermédiaires éventuels de cette même réaction glucose-glycocolle dans des conditions diverses, et en particulier en milieu « sec ».

— En étudiant les réactions d'autres sucres et d'autres amino-acides.

— En examinant les possibilités offertes par ces techniques (ecclusion et spectrophotométrie) pour l'étude de réactions sucres-protéines.

1° Réaction glucose-glycocolle dans différentes conditions.

a) Action du pH, en solution.

En milieu acide le principal responsable de l'absorption U-V, parmi les précurseurs incolores, est le 5-HMF. Il semble que dans ces conditions la réaction de brunissement soit surtout, mais non uniquement, due à une réaction du glycocolle avec le 5-HMF provenant de la dégradation acide du glucose et non à la réaction de Maillard proprement dite entre le glucose et le glycocolle.

En milieu maintenu neutre par addition d'un excès de CO_3Ca, le brunissement est accentué par rapport à celui observé dans un milieu où le pH évolue normalement vers les valeurs acides. D'autre part, cette neutralité favorise l'accumulation de 296 Ca et en même temps provoque la formation de deux nouveaux intermédiaires caractérisés à la fois par leur localisation dans l'effluent et leur maxima d'absorption U-V = 255 et 290 mμ respectivement. Ces deux corps se différencient également par leurs solubilités : « 290 » est éthéro soluble, « 255 » reste en phase aqueuse.

b) Action de la concentration et du rapport des concentrations initiales.

On a vu plus haut l'action de ces facteurs sur l'accumulation de « 296 ». Du point de vue des autres constituants éventuels décelables par cette technique, rien d'autre n'est à signaler dans le cas où la concentration de l'un des constituants étant maintenue élevée l'autre est ajustée à des valeurs inférieures. Par contre, lorsque la dilution globale du milieu initial s'accroît, en même temps que la quantité de 296 diminue au point d'être indosable, on voit augmenter graduellement la concentration d'autres composés repérés par un maximum d'absorption à 245 mμ (en milieu N/5) et 225 mμ (en milieu N/10).

Pour explorer le domaine des concentrations élevées le travail a été conduit non plus en solution, mais en milieu initialement sec, mis ensuite en équilibre avec des milieux d'humidité relative et de température variables. Les essais se poursuivent actuellement et il n'est pas encore possible de tirer des conclusions générales. En première indication, on constate que les nouvelles conditions expérimentales permettent de mettre en évidence plusieurs composés intermédiaires, dont l'un, absorbant au maximum à 325 mμ, pourra vraisemblablement être isolé par cette méthode de fractionnement. Deux autres responsables de l'absorption U-V, ayant leur maxima d'absorption à 285 et 235 mμ respectivement et présents en quantités moins importantes, sont d'une caractérisation moins facile. D'autre part, il semble que l'abaissement de température et d'humidité conduise surtout à l'accumulation des composés absorbant à faibles

longueurs d'onde (225 à 235 mμ), qui pourraient avoir une structure d'aldéhyde éthylénique. La température peut n'agir que sur les vitesses de chacune des réactions partielles, synthèse et dégradation des composés intermédiaires, et non sur leur nature ; mais il est également possible que selon la grandeur de la température la réaction de Maillard prenne des voies différentes.

2° Réaction entre sucres et amino-acides divers.

a) Glycocolle et différents sucres.

— Par réaction en solution N/1 à 90°C, fructose et saccharose donnent qualitativement les mêmes intermédiaires absorbant dans l'U-V que le glucose.

— Un diholoside réducteur, le maltose, donne par contre des constituants intermédiaires de spectre totalement différents et en nombre beaucoup plus importants. Quatre au moins ont été repérés par leurs spectres, leur localisation dans le fractionnement et leurs solubilités : deux, insolubles dans l'éther, ayant des maxima d'absorption à 350 et 290 mμ respectivement ; deux autres, éthéro-solubles, de $\lambda_M = 294$ et 282, dont le second est beaucoup moins hydrosoluble que le premier.

— Un pentose réducteur, l'arabinose, conduit de même à des spectres U-V en partie différents. Dans l'effluent de rinçage on distingue par ecclusion au moins trois constituants avec des maxima respectifs à 300, 290, 275 et 292 mμ, dans l'ordre de leur apparition dans le fractionnement, mais il existe également un constituant de $\lambda_M = 340$ mμ retenu par l'échangeur ou détruit au cours du fractionnement.

Nous avons également examiné les produits de la réaction du glycocolle et du 5-HMF et avons pu identifier un constituant de $\lambda_M = 335$ qui risque d'être identique à celui repéré au mieux dans les mélanoïdines de glucose et de glycocolle en milieu « sec ».

b) Glucose et différents amino-acides.

Comme dans le cas précédents, nous n'avons fait qu'une exploration rapide dans ce domaine, pour voir quelles étaient les possibilités de la méthode et l'allure générale des phénomènes en vue d'une éventuelle étude ultérieure plus approfondie.

Les essais ont été effectués en milieux pâteux à 90°C avec des proportions équimoléculaires de glucose et des amino-acides suivants, choisis en fonction de leur structure : glycocolle-alanine α-phénylalanine-acide aspartique-lysine-tryptophane-histidine-proline.

Les spectres d'absorption U-V globale se classent en trois groupes ayant chacun une allure générale typique :

1. Glycocolle, alanine α, proline.
2. Acide aspartique, phénylalanine.
3. Tryptophane, histidine.

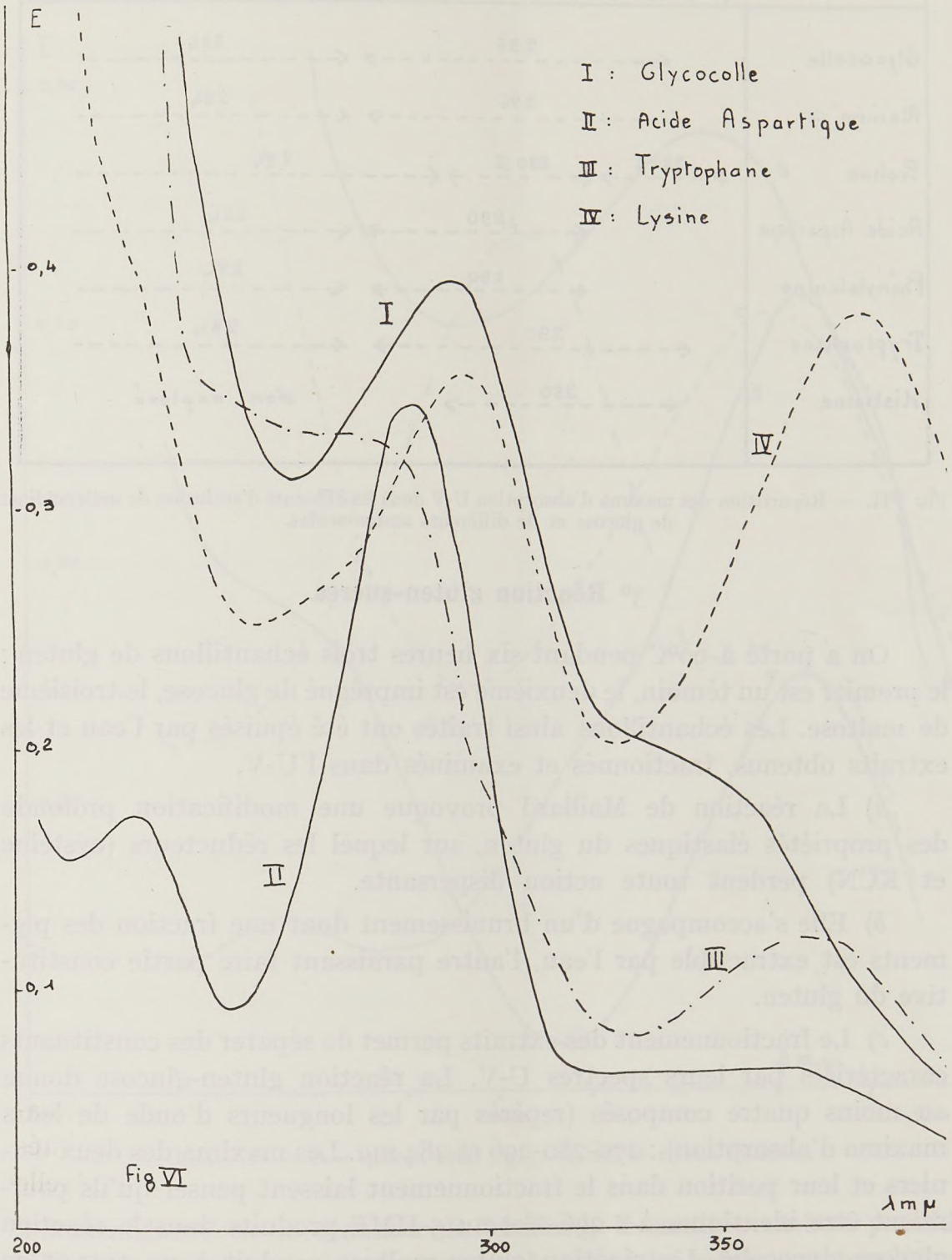


FIG. VI.

La mélanoïdine provenant de la lysine possède un spectre intermédiaire entre celui du groupe 1 et celui du groupe 2 (fig. VI).

Mais le fractionnement peut faire apparaître des différences notables entre ces milieux analogues du point de vue spectre global. Le tableau de la figure VII résume schématiquement les résultats de ces essais.

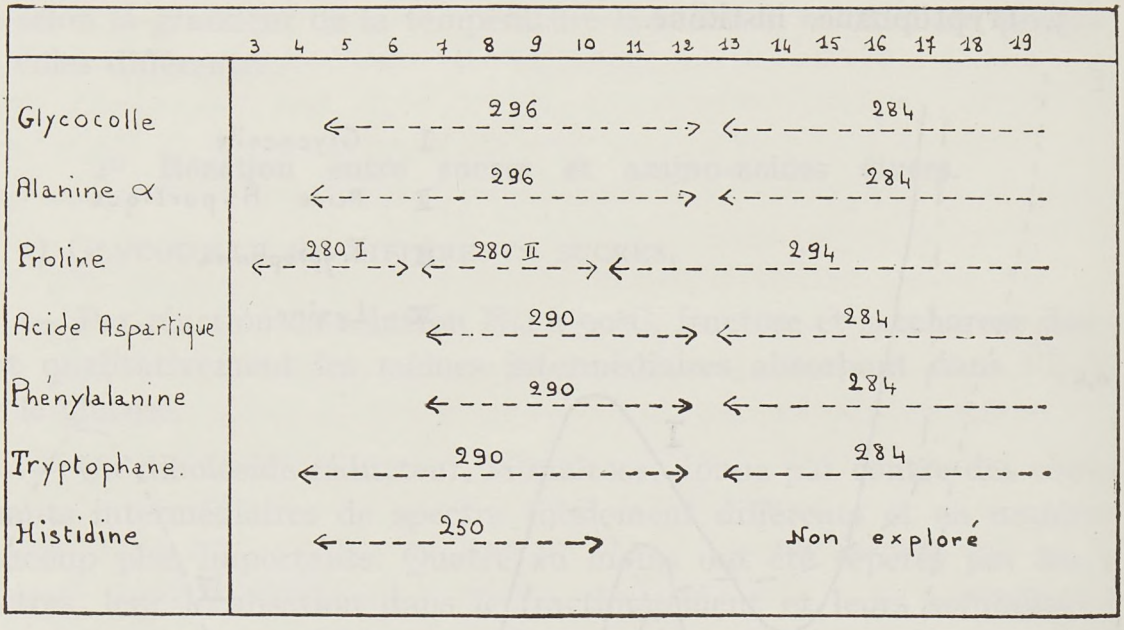


FIG VII. — Répartition des maxima d'absorption U-V dans les effluents d'ecclusion de mélanoïdines de glucose et de différents amino-acides.

3° **Réaction gluten-sucres.**

On a porté à 90°C pendant six heures trois échantillons de gluten ; le premier est un témoin, le deuxième est imprégné de glucose, le troisième de maltose. Les échantillons ainsi traités ont été épuisés par l'eau et les extraits obtenus, fractionnés et examinés dans l'U-V.

a) La réaction de Maillard provoque une modification profonde des propriétés élastiques du gluten, sur lequel les réducteurs (cystéine et KCN) perdent toute action dispersante.

b) Elle s'accompagne d'un brunissement dont une fraction des pigments est extractible par l'eau, l'autre paraissant faire partie constitutive du gluten.

c) Le fractionnement des extraits permet de séparer des constituants caractérisés par leurs spectres U-V. La réaction gluten-glucose donne au moins quatre composés (repérés par les longueurs d'onde de leurs maxima d'absorption) : 270-280-296 et 284 mμ. Les maxima des deux derniers et leur position dans le fractionnement laissent penser qu'ils pourraient être identiques à « 296 » et au 5-HMF produits dans la réaction glucose-glycocolle. La réaction gluten-maltose conduit à un extrait en apparence moins complexe puisque l'on ne distingue nettement que deux types de maxima d'absorption, l'un à 270 mμ, l'autre à 280 mμ. En réalité il est possible que chacun de ces spectres corresponde lui-même à un

mélange de corps à maxima voisins. Dans ce cas, il est nécessaire d'améliorer la technique de fractionnement.

Quoiqu'il en soit, ces essais montrent l'utilité de cette méthode d'analyse dans le cas de la réaction sucre-gluten et vraisemblablement dans le cas général de la réaction sucres-protides. Ils montrent aussi que, par

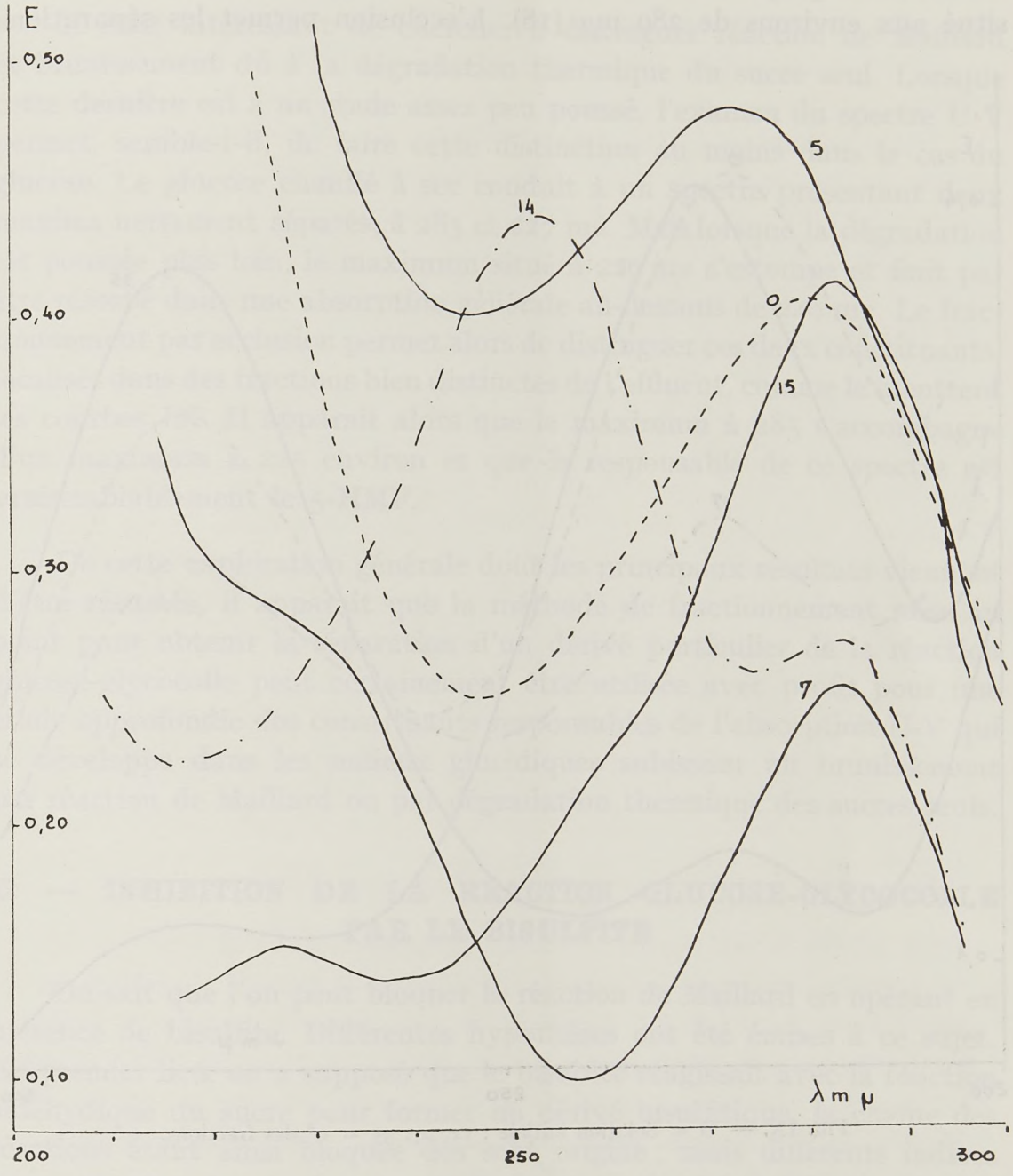


FIG. VIII — O = extrait total ; 5, 7. 14, 15, = n° des fractions.

l'intermédiaire de la réaction de Maillard, il serait peut-être possible d'obtenir quelques renseignements sur le gluten lui-même, en complétant les indications de la spectrophotométrie par celles d'autres techniques : hydrolyse enzymatique ou acide ménagée et identification des acides aminés terminaux en particulier.

4° Pigments de la croûte de pain.

Un cas particulier de cette réaction protides-sucres dans les milieux naturels est celui des pigments de la croûte de pain (17). Les extraits de croûte de pain présentent un spectre U-V global dont l'allure générale est celle des préparations de mélanoïdines, mais dont le maximum est situé aux environs de 280 mμ (18). L'ecclusion permet les séparations

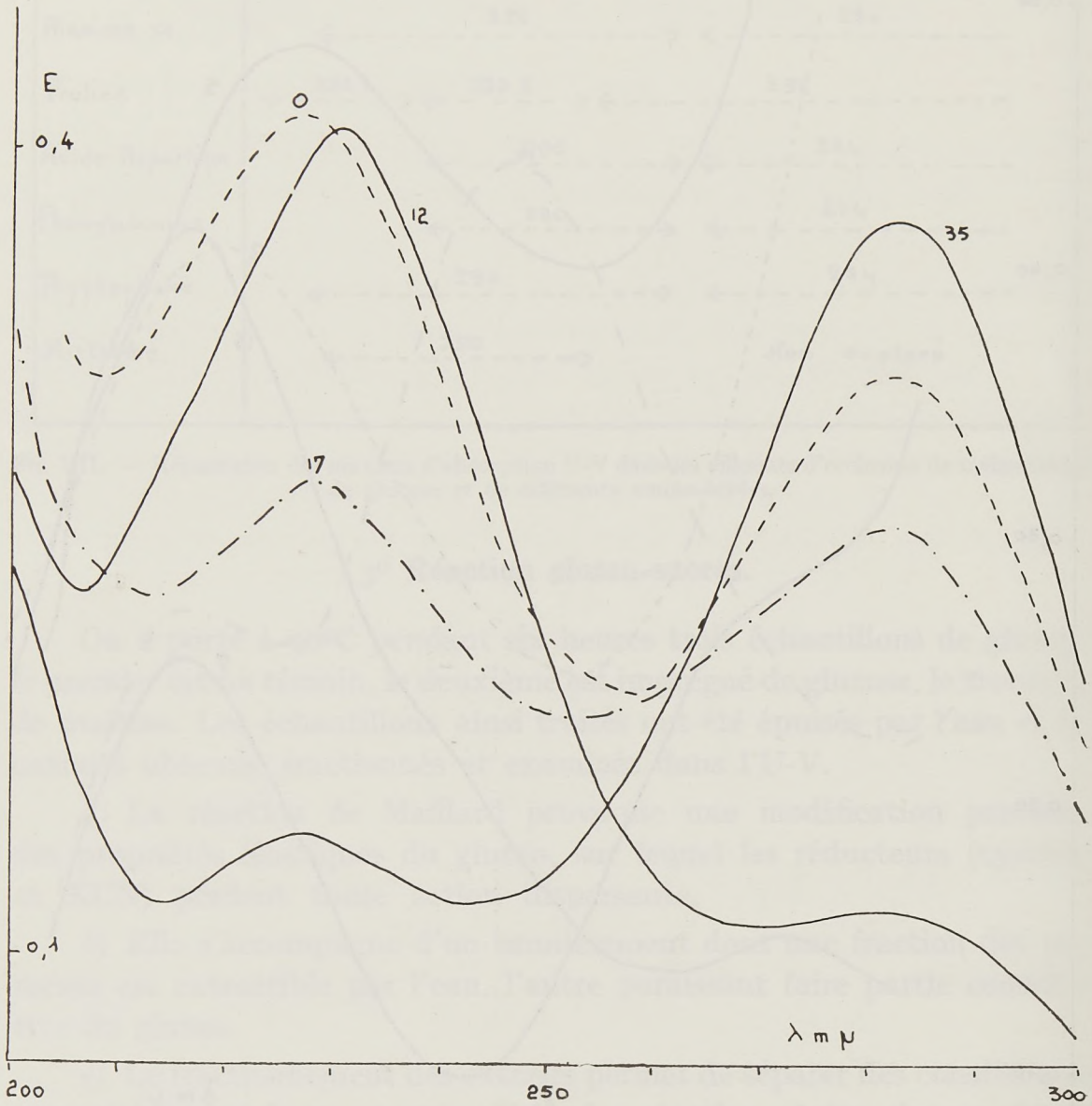


FIG. IX. — 0 = Solution initiale ; 12, 27, 35 = n° des fractions.

illustrées (fig. VIII) par les différents types de spectres rencontrés dans les fractions successives. Dans l'échantillon en expérience, quatre constituants différents sont aisément repérés, qu'aucun accident dans la courbe d'absorption globale (courbe 0) ne permettait de soupçonner. L'extrait d'un autre échantillon, moins pigmenté, présentait un spectre global analogue, à l'intensité près, à celui figuré ici. Mais le fractionnement ne permet de déceler que deux constituants au lieu des quatre de l'essai décrit ci-dessus.

Il semble donc que cette technique pourrait servir de base à une étude des pigments U-V de la croûte de pain, à condition de préparer des échantillons de croûte de façon reproductible quitte à s'écarter initialement des conditions exactes de la boulangerie.

5° **Comparaison avec les produits de dégradation thermique des sucres.**

Il était intéressant de chercher à distinguer réaction de Maillard et brunissement dû à la dégradation thermique du sucre seul. Lorsque cette dernière est à un stade assez peu poussé, l'examen du spectre U-V permet, semble-t-il, de faire cette distinction au moins dans le cas du glucose. Le glucose chauffé à sec conduit à un spectre présentant deux maxima nettement séparés, à 285 et 227 mμ. Mais lorsque la dégradation est poussée plus loin, le maximum situé à 227 mμ s'estompe et finit par être résorbé dans une absorption générale au-dessous de 240 mμ. Le fractionnement par ecclusion permet alors de distinguer ces deux constituants, localisés dans des fractions bien distinctes de l'effluent, comme le montrent les courbes IX. Il apparaît alors que le maximum à 285 s'accompagne d'un maximum à 225 environ et que le responsable de ce spectre est vraisemblablement le 5-HMF.

De cette exploration générale dont les principaux résultats viennent d'être résumés, il apparaît que la méthode de fractionnement mise au point pour obtenir la séparation d'un dérivé particulier de la réaction glucose-glycocolle peut certainement être utilisée avec profit pour une étude approfondie des constituants responsables de l'absorption U-V qui se développe dans les milieux glucidiques subissant un brunissement par réaction de Maillard ou par dégradation thermique des sucres seuls.

C. — INHIBITION DE LA RÉACTION GLUCOSE-GLYCOCOLLE PAR LE BISULFITE

On sait que l'on peut bloquer la réaction de Maillard en opérant en présence de bisulfite. Différentes hypothèses ont été émises à ce sujet. En premier lieu, on a supposé que le bisulfite réagissait avec la fonction aldéhydique du sucre pour former un dérivé bisulfitique, la chaîne des réactions étant ainsi bloquée dès sont origine ; mais différents indices ne sont pas en faveur de cette explication simple. On a alors pensé que le même type de blocage pourrait intervenir sur le groupement aldéhydique du 5-HMF. Enfin, d'autres auteurs pensent que l'inhibition pourrait jouer sur un composé intermédiaire, encore hypothétique, entre le N-glycoside ou le C. A. D. F. et le 5-HMF. En bref, le mécanisme exact est encore à mettre en évidence ; cependant d'un point de vue tant théorique que pratique la connaissance de ce mécanisme est d'un intérêt certain (19).

I. — Réaction de Maillard en présence de bisulfite.

Lorsqu'on chauffe glucose et glycocolle en présence de SO_3NaH, le mélange reste d'abord clair puis jaunit ; le pigment jaune s'accumule progressivement et après un certain temps (environ 24 h à 90°C en milieu M/1 en glucose et en glycocolle et 0,5 M en SO_3NaH) la coloration brune des mélanoïdines apparaît et va en s'intensifiant. On note que ce brunissement commence à se manifester lorsque l'odeur de SO_2 disparait du milieu.

Il ne semble pas que l'accumulation du N-carboxy-methylamino 1-deoxy 1-fructose (C. A. D. F.) soit profondément influencée par la présence de bisulfite. Ce qui peut signifier ou bien que le C. A. D. F. ne joue pas le rôle important qui lui est attribué, ou bien que l'action du bisulfite se situe à un stade ultérieur et que le blocage qui intervient s'effectue avec une constante de vitesse du même ordre de grandeur que celle de la réaction normale de brunissement.

Par ecclusion suivie d'examen spectrophotométrique des fractions de l'effluent on peut séparer différents constituants du mélange. Compte-tenu des composants apportés par le bisulfite lui-même (le bisulfite pur Merck est décomposé en trois constituants par ecclusion) on identifie un produit de réaction, ou du moins un groupe de produits rassemblés dans des fractions caractérisées par une absorption U-V qui présente un maximum au voisinage de 288 mμ, dont l'intensité augmente avec le temps de réaction. Lorsque la totalité de SO_3NaH a été consommée, on voit s'accumuler progressivement « 296 » et, plus tard, 5-HMF. Il semble donc que les fractions « 288 » représentent le ou un des produits de blocage de la réaction de Maillard.

II. — Recherches sur les propriétés des fractions « 288 ».

Le travail a été poursuivi avec des préparations M/1 en glucose et en glycocolle, M/2 en SO_3NaH, chauffées 18 h à 90°C. Dans ces conditions, il reste un excès de SO_3NaH et on ne forme ni 296, ni 5-HMF. On sépare complètement les fractions « 288 » du bisulfite et du glucose en excès par ecclusion sur Dowex 50 X 4, 50-100 mesh. La fraction d'effluent ainsi isolée qui contient du soufre mais pas d'azote présente de plus certaines propriétés caractéristiques :

1° *Absorption ultra-violette.* — L'absorption globale à 288 mμ est due à la superposition d'au moins trois constituants : l'un extractible par l'éther, les deux autres non extractibles. Parmi ces derniers l'un absorbe au maximum à 290 mμ environ et donne au spectre son allure générale ; l'autre a son maximum dans la zône 330-340 mμ. Par neutralisation ou alcalinisation, on renforce nettement ce dernier maximum. Le com-

posé ethero soluble a un maximum d'absorption situé à 284 mμ, dont la position et l'intensité sont indépendants du pH. Il est possible que ce composé soit un produit de décomposition en équilibre avec l'un des deux, ou les deux, composés hydrosolubles.

2° *Acidité.* — Les fractions « 288 » sont fortement acides. Le titrage potentiométrique montre l'existence de deux acides de forces différentes dont on a suivi les évolutions en fonction du temps de chauffage ; initialement les concentrations sont toutes deux croissantes, puis l'une diminue alors que l'autre augmente, la somme des deux restant constante. Il s'agit là d'acidité fixes, non éliminées par barbottage d'azote ou ébullition.

3° *Composés réducteurs et carbonylés.* — Ces mêmes fractions contiennent des composés qui réduisent la liqueur de Fehling et sont dosables par la méthode de Shaffer-Hartmann. Par action du phtalate acide d'aniline sur une goutte de solution déposée sur papier et séchée à 100°, on observe le développement d'une coloration rose qui vire ensuite au brun par chauffage prolongé. Après chromatographie dans un mélange butanol-pyridine-eau (15-50-20) on sépare une tache (R_F = 0,75) qui donne directement la coloration brune avec ce même réactif. Il est vraisemblable que la coloration rose observée par réaction directe du matériel non fractionné est dûe à l'action préalable de l'acidité du milieu.

Enfin ces fractions donnent un précipité avec la 2-4-dinitrophénylhydrazine, lentement à température ambiante, immédiatement au bain-marie bouillant. On obtient un mélange de phénylhydrazones dont la composition varie avec les conditions de précipitation et qui a pu être fractionné par solubilisations successives dans le chloroforme, l'eau et le méthylcellosolve, chaque solution étant caractérisée par son spectre. En prolongeant le temps de précipitation, on diminue les quantités de 2-4 D. N. P. H. hydro- et méthylcellosolve-solubles au profit de la fraction chloroforme-soluble. On sépare au mieux les 2-4 D. N. P. H. après une précipitation de 15 h à 90°C ; on peut alors distinguer deux composants seulement : une 2-4 D. N. P. H. soluble dans le chloroforme dont le spectre présente un maximum à 383 mμ ; une autre, dont la pureté est encore douteuse, soluble dans le méthylcellosolve et dont le maximum d'absorption se situe vers 393 mμ. Par élévation du pH, la première se transforme en la seconde avec mise en liberté de 2-4 dinitrophénylhydrazine. Il semble donc que l'on se trouve en réalité en présence d'un seul composé polycarbonylé capable de former plusieurs types de précipités avec la phénylhydrazine.

4° *Action d'un échangeur d'anions.* — Si on met les fractions « 288 » en présence de Dowex X1, on élimine à la fois les acides, les composés absorbant dans l'U-V insolubles dans l'éther et tous les constituants

carbonylés donnant des 2-4 D. N. P. H. L'élution ne permet de récupérer que très partiellement ces composés. Il est vraisemblable qu'il s'agit non d'un échange d'ions mais d'une réaction de groupes carbonyles avec les groupements ammonium quaternaire de la résine, du type de celle déjà observée avec « 296 ». On ne peut donc conclure que les fonctions acides et carbonyles sont portées par les mêmes molécules.

5° *Comparaison avec les dérivés bisulfitiques de* 5-*HMF et de* « 296 ». — On a fait réagir 5-HMF et « 296 » avec SO_3NaH dans des conditions analogues à celles réalisées au cours de l'inhibition des mélanoïdines. Dans les deux cas, les produits obtenus diffèrent de « 288 » par leurs spectres et leurs localisations dans l'effluent au cours de l'ecclusion. Il est donc peu vraisemblable que la réaction de Maillard se trouve bloquée par le bisulfite au niveau du 5-HMF ; par contre ces résultats, joints aux observations relatives à l'accumulation du C. A. D. F. appuient l'hypothèse selon laquelle l'inhibition jouerait à un stade intermédiaire entre ces deux composés.

CONCLUSION

Au cours de ce travail, la technique de fractionnement par ecclusion a été largement utilisée et ses possibilités dans le domaine de la réaction de Maillard ont été explorées. Du seul point de vue de l'absorption ultra-violette, elle permet de mettre en évidence des constituants multiples là où le spectre global était apparemment simple. Dans des milieux aussi complexes ce n'est cependant pas une méthode en général suffisante à elle seule — il n'y a aucune raison qu'elle le soit — et pour obtenir des produits purs, il est nécessaire de la conjuguer à d'autres techniques appropriées.

Dans de telles conditions, elle a permis d'isoler, à l'état pur et en quantités suffisantes pour en faire l'analyse élémentaire et fonctionnelle, un des composés responsables de l'absorption ultra-violette des mélanoïdines de glucose et de glycocolle. La détermination de sa structure devrait conduire à préciser les premières étapes du processus de dégradation des molécules de sucre et d'amino-acide. D'autres composés, obtenus par analyse de réactions de Maillard inhibées par le bisulfite, sont en cours d'isolement ; on peut penser que l'étude de leur constitution permettra de progresser dans la définition du ou des points de blocage de la réaction.

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

(1) Enders (C.). — Zur Kenntnis der Melanoïdine. *Kolloïd Z.*, **85**, 74-87, 1938.
(2) Danehy (J. P.), Pigman (W. W.). — Reactions between sugars and nitrogenous compounds and their relationship to certain food problems *Adv. Food. Res.*, **3**, 241-290, 1951.

(3) Hodge (J. E.). — Chemistry of browning reactions in model systems. *Agr. Food. Chem.*, **1**, n° 15, 928-943, 1953.
(4) Cremer (H. D.), Menden (E.). — Über nicht enzymatische Bräunungsreaktionen und ihre physiologischen Folgen. I. *Zeitsch. Lebensm. Unters. Forsch.*, **104**, n° 1, 33-43, 1956.
Menden (E.), Cremer (H. D.). — II. *Ibid.*, **104**, n° 2, 105-121, 1956.
(5) Petit (L.). — Étude chromatographique de la réaction sucres-aminoacides. Communication au IXe Congrès Intern. Ind. Agr., Rome, 27 mai-1er juin 1952.
(6) Blass (J.), Machebœuf (M.), Nunez (G.). — Méthode de microdosage des oses pouvant s'appliquer à l'étude des spots de chromatogrammes sur papier. *Bull. Soc. Chim. Biol.*, **32**, 130, 1950.
(7) Roudier (A.). — Méthode simplifiée et améliorée d'analyse quantitative des mélanges de sucres utilisant la chromatographie de partage sur papier filtre. Mode opératoire détaillé. *Memor. Serv. Chim. Etat*, **36**, n° 2, 155, 1951.
(8) Täufel (K.), Iwainsky (H.). — Analytische und chromatographische. Studien zur « Maillard-Reaktion ». *Biochem. Zeitsch.*, **323**, 299, 1952.
(9) Richards (E. L.). — Non-enzymic browning : the reaction between D-glucose and glycine in the « dry » state. *Biochem. J.*, **64**, n° 4, 639, 1956.
(10) Petit (L.). — Complexion du cuivre par les produits de la réaction de Maillard ;dosage d'un intermédiaire de la formation des mélanoïdines. *C. R. Ac. Sci.*, **242**, 829, 1956.
(11) Quintin (Mlle M.). — Complexes du glycocolle et de l'ion Cu. *J. Chim. Phys.*, **47**, n° 11-12, 898, 1950.
(12) Wolfrom (M. L.), Schuetz (R. D.), Cavalieri (Liebe F.). — Chemical interactions of amino compounds and sugars. III. The conversion of D-glucose to 5-hydroxymethyl 2-furaldehyde. *J. Am. Chem. Soc.*, **70**, 514, 1948.
(13) Petit (L.). — Recherches sur le brunissement non enzymatique des milieux glucidiques. Méthode de fractionnement. *C. R. Ac. Sci.*, **244**, 2 326, 1957.
(14) Dubourg (J.) Devillers (P.). — Contribution à l'étude de la réaction de Maillard. *Bull. Soc. Chim. France*, **3**, 333, 1957.
(15) Chichester (C. O.), Stadtman (F. H.) and Mac Kinney (G.). — On the products of the Maillard reaction. *J. Am. Chem. Soc.*, **74**, 3 418, 1952.
(16) Keeney (M.). — Regeneration of carbonyls from 2-4 dinitrophenylhydrazones with levulinic acid. *Annal. Chem.*, **29**, 1 489, 1957.
(17) Bertram (G. L.). — Studies on crust color. I. Importance of the browning reaction in determining the crust color of bread. *Cereal Chem.*, **30**, n° 2, 127, 1953.
(18) Deschreider (A. R.). — Étude sur la formation du pigment brun dans la croûte du pain. *Bull. Ecole Meunerie Belge*, **17**, n° 6, 96, 1956.
(19) Gehman (H.), Osman (Elisabeth M.). — The Chemistry of the sugar sulfite reaction and its relationship to food problems. *Adv. Food. Res*, **5**, 53, 1954.

INFLUENCE DE LA RACE DES VACHES LAITIÈRES SUR LA COMPOSITION DE LA MATIÈRE GRASSE DU LAIT ET LA QUALITÉ DU BEURRE

PAR

Simone KUZDZAL-SAVOIE

Station centrale de Recherches laitières, Jouy-en-Josas.
Avec la collaboration technique de L. BEYELER.

I. — INTRODUCTION

Les variations du taux butyreux moyen du lait et les variations de coloration de la matière grasse du lait, en fonction de la race, sont des questions bien connues. Par contre peu d'auteurs ont étudié l'influence de la race des vaches laitières sur la composition de la partie saponifiable de la matière grasse du lait.

En Suède, SWARTLING et MATTSSON (1), au cours d'une étude sur la composition du lait produit par des vaches de différentes races (Jerseyaise, Swedish Lowland Breed, Swedish Red Breed), ont montré que l'indice d'iode de la matière grasse du lait produit par les vaches de race Jerseyaise est inférieur de deux à trois unités à l'indice d'iode de la matière grasse du lait produit par les vaches des deux autres races. Ces auteurs relèvent en outre une légère différence pour l'acidité volatile mais seulement pendant la période de stabulation.

Au Danemark, PEDERSEN (2) relève que l'indice d'iode de la matière grasse du lait produit par les vaches de race Jerseyaise peut être de 6 unités inférieur à l'indice d'iode de la matière grasse du lait produit par les vaches de la race Rouge Danoise.

En Nouvelle-Zélande, MAYHEAD et BARNICOAT (3) rapportent également que l'indice d'iode de la matière grasse du lait produit par des vaches de race Jerseyaise reste constamment inférieur à l'indice d'iode correspondant du lait produit par des vaches de race Frisonne Pie Noire ; la différence varie de une à cinq unités.

En France, l'étude comparée de la composition de la matière grasse du lait produit par des vaches de races différentes, présente un intérêt

particulier du fait de l'existence de nombreuses races de vaches laitières et du fait aussi de la diversité des caractéristiques (couleur, arôme, consistance) du beurre produit dans les grandes régions beurrières (Normandie, Charentes, Est et Alsace). Dans ces régions plusieurs races de vaches laitières coexistent, mais l'une d'entre elles est dominante (Normande, Parthenaise, Frisonne Pie Noire, Pie Rouge de l'Est) et il est important de préciser dans quelle mesure la race des vaches laitières joue un rôle dans la détermination des caractéristiques du beurre.

Dans la région des Charentes et du Poitou cette question présente actuellement un intérêt particulier pour les agriculteurs. En effet la race parthenaise qui jusqu'à maintenant prédominait, tend à disparaître progressivement. Les animaux de cette race étaient autrefois utilisés simultanément comme bêtes de trait et pour la production laitière, celle-ci restant toutefois limitée. Peu à peu, les éleveurs se sont équipés en mules et en tracteurs et se sont orientés, pour la constitution de leur cheptel laitier, vers des races meilleures productrices de lait telles que la race Normande et, très récemment, la race Frisonne Pie Noire. Il semble que rien à l'heure actuelle ne puisse efficacement combattre le mouvement qui s'est ainsi dessiné ; la question s'est donc posée de savoir si une telle situation n'allait pas modifier les caractéristiques si appréciées du beurre produit dans la région des Charentes et du Poitou. C'est la raison pour laquelle a été entreprise à Echiré (Deux-Sèvres) une expérimentation qui devait permettre de répondre à cette question. Simultanément une expérimentation semblable a été poursuivie au Centre National de Recherches Zootechniques à Jouy-en-Josas (Seine-et-Oise), sur des vaches de race Normande, Frisonne Pie Noire et Pie Rouge de l'Est. Les résultats de cette dernière étude sont rapportés dans une communication séparée (4).

II. — MÉTHODE EXPÉRIMENTALE

A. — Choix de la zone d'expérimentation.

On a tout d'abord cherché dans la région des Charentes des étables dans lesquelles les races Parthenaise, Normande et Frisonne Pie Noire étaient représentées. De telles étables sont très rares, et, lorsqu'elles existent, le nombre de vaches laitières de chaque race sur lesquelles une expérimentation valable peut être menée reste faible, de l'ordre de trois à six animaux.

L'idée d'une expérimentation portant sur un nombre réduit de vaches laitières soumises aux mêmes conditions extérieures (mode de vie, alimentation) a donc été abandonnée. On lui a préféré une expérimentation portant sur un troupeau entier, vivant toutefois dans une région limitée

et bien définie. Des conditions favorables d'expérimentation ont été rencontrées à la laiterie coopérative d'Echiré (Deux-Sèvres). Dans cette laiterie, un numéro est attribué à chaque producteur-sociétaire. Ce nu-

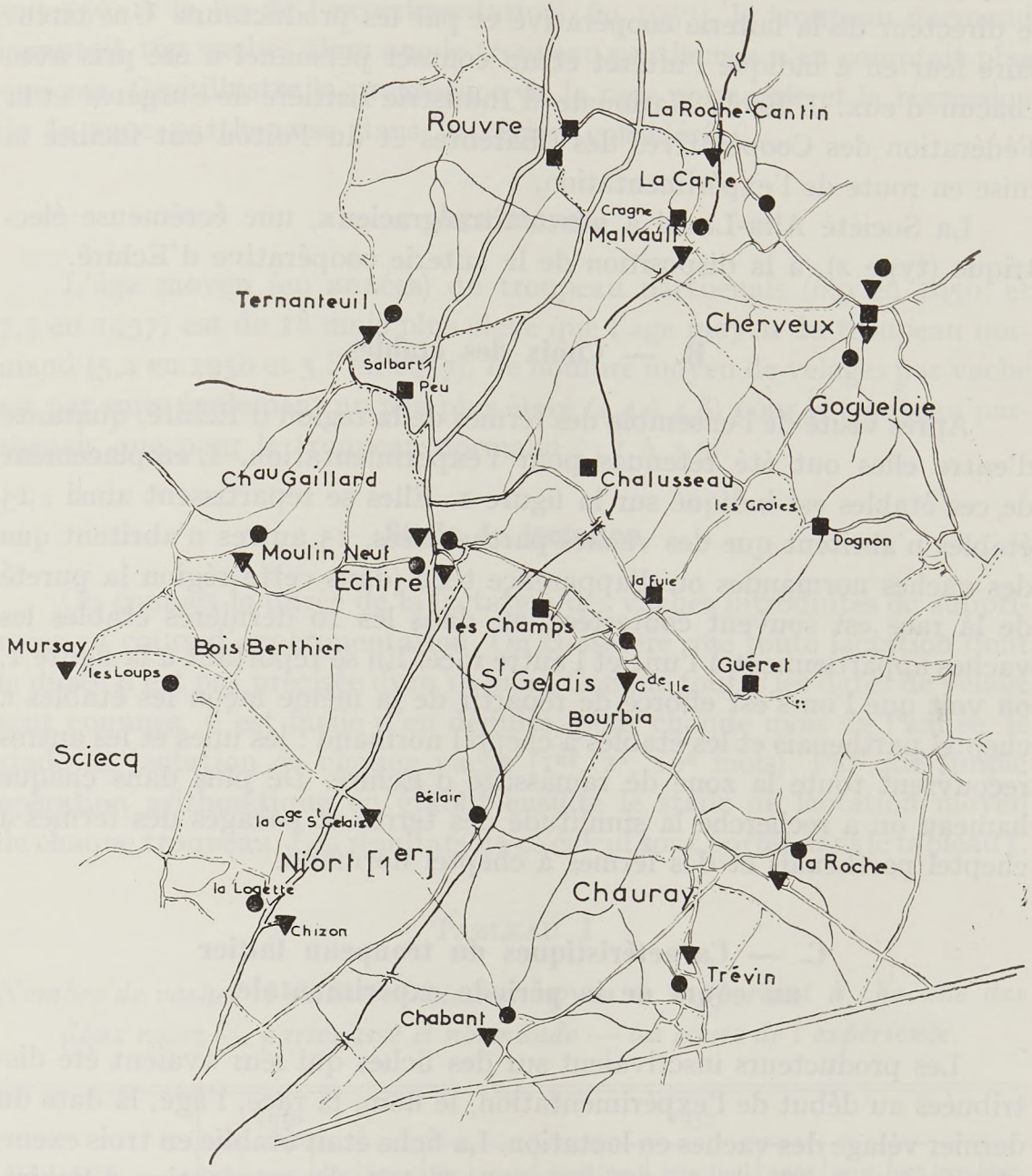


FIG 1. — Répartition des étables retenues pour l'expérimentation.

● étables à cheptel normand.
▼ étables à cheptel parthenais.
■ étables à cheptel mixte.

méro est également inscrit sur les bidons de lait. Il est ainsi facile d'identifier, à la laiterie même, le lait provenant de chaque étable. Le troupeau laitier de la zone de ramassage de la laiterie coopérative d'Echiré est constitué par un nombre à peu près égal de vaches normandes et parthenaises, mais ne compte, malheureusement pour notre étude, que quelques vaches

de race Frisonne Pie Noire. Nous ne pouvions donc envisager qu'une comparaison de la qualité du beurre fabriqué à partir, d'une part, de crème « parthenaise » et d'autre part, de crème « normande ».

Le meilleur accueil a été réservé à ce projet d'expérimentation par le directeur de la laiterie coopérative et par les producteurs. Une circulaire leur en a indiqué l'intérêt et un contact personnel a été pris avec chacun d'eux. L'École Nationale d'Industrie Laitière de Surgères et la Fédération des Coopératives des Charentes et du Poitou ont facilité la mise en route de l'expérimentation.

La Société Alfa-Laval a mis à titre gracieux, une écrémeuse électrique (type 2), à la disposition de la laiterie coopérative d'Echiré.

B. — Choix des étables.

Après visite de l'ensemble des fermes de la région d'Echiré, quarante d'entre elles ont été retenues pour l'expérimentation. L'emplacement de ces étables est indiqué sur la figure 1. Elles se répartissent ainsi : 15 étables n'abritent que des vaches parthenaises, 15 autres n'abritent que des vaches normandes ou d'apparence telle (dans cette région la pureté de la race est souvent contestée), et, dans les 10 dernières étables les vaches appartiennent à l'une et l'autre race. En se reportant à la figure 1, on voit que l'on s'est efforcé de répartir de la même façon les étables à cheptel parthenais et les étables à cheptel normand : les unes et les autres recouvrent toute la zone de ramassage d'Echiré. De plus dans chaque hameau on a recherché la similitude des terres et pacages des fermes à cheptel parthenais et des fermes à cheptel normand.

C. — Caractéristiques du troupeau laitier au cours de la période expérimentale.

Les producteurs inscrivaient sur des fiches qui leur avaient été distribuées au début de l'expérimentation, le nom, la race, l'âge, la date du dernier vêlage des vaches en lactation. La fiche était établie en trois exemplaires, un pour le producteur, un pour la laiterie coopérative d'Echiré, et un pour la Station Centrale de Microbiologie et Recherches laitières de Jouy-en-Josas. Les producteurs devaient indiquer, à la laiterie, tout changement intervenant dans leur cheptel (fin ou début de lactation, vente ou achat d'animaux, etc.). Ces renseignements étaient transmis périodiquement à la Station de Jouy-en-Josas sur des fiches intitulées « modification du cheptel ». Il était ainsi possible de connaître à tout moment le nombre de vaches en lactation, le stade de lactation moyen, l'âge moyen etc., de chacun des troupeaux (le troupeau parthenais ou le troupeau normand).

Nombre de vaches.

Au début de l'expérimentation (octobre 1956) le troupeau parthenais et le troupeau normand comptaient le même nombre de vaches, soit 150. A la fin de l'expérimentation (fin 1957), le troupeau normand comptait 167 vaches alors que le troupeau parthenais n'en comptait plus que 141. Ceci illustre la progression de la race normande et la régression de la race parthenaise dans la région considérée.

Age moyen.

L'âge moyen (en années) du troupeau parthenais (6,9 en 1956, et 7,3 en 1957) est de 18 mois plus élevé que l'âge moyen du troupeau normand (5,4 en 1956 et 5,8 en 1957). Le nombre moyen de vélages par vache est par suite également un peu plus élevé (4,4 à 4,8) pour le troupeau parthenais que pour le troupeau normand (3,1 à 3,3).

Stade de lactation.

On connaît la durée de la lactation des vaches introduites ou supprimées en cours d'expérimentation. On considère que toute lactation dont la durée n'est pas précisée dure 10 mois. Comme toutes les dates de vélage sont connues, il est facile d'en déduire, pour chaque mois de l'année, le stade de lactation de chaque vache (1er, 2e, 10e mois). Par une simple opération arithmétique on établit ensuite le stade de lactation moyen de chaque troupeau. Les résultats de ce calcul sont portés dans le tableau I.

TABLEAU I

Nombre de vaches et stade de lactation moyen se rapportant à chacune des deux races — partenaise et normande — au cours de l'expérience,

	1956			1957										
	oct.	nov.	déc.	janv.	fév.	mars	avril	mai	juin	juil.	août	sept.	oct.	nov.	déc.
Nombre de vaches en lactation															
Race Normande	140	130	115	113	119	129	137	144	149	150	148	147	135	119	94
Race Parthenaise	137	130	114	101	87	107	115	125	115	121	127	124	117	102	89
Stade de lactation moyen (en mois)															
Race Normande	6,2	6,7	6,6	6,0	5,0	4,6	4,6	4,2	4,5	4,9	5,5	6,4	7,1	7,7	8,1
Race Parthenaise	6,7	7,1	6,8	6,0	5,2	4,6	4,4	4,3	4,5	4,9	5,5	6,2	6,7	7,2	7,8

Les stades de lactation moyens des troupeaux parthenais et normands sont constamment très voisins et souvent égaux.

D. — Modalités du prélèvement.

Le prélèvement a lieu toutes les trois semaines, généralement le lundi, sur le lait de la traite du matin. La veille, le producteur-sociétaire de la laiterie coopérative est avisé par le laitier qui effectue le ramassage, qu'il devra le lendemain matin livrer séparément le lait de la traite du matin et le lait de la traite de la veille au soir. En même temps le laitier remet des étiquettes au producteur. Ces étiquettes sont accrochées aux bidons contenant le lait du matin. Elles sont rouges pour les bidons contenant du lait de vaches parthenaises et bleues pour les bidons contenant du lait de vaches normandes. Dans les 10 étables retenues pour l'expérimentation et abritant des vaches de race parthenaise et des vaches de race normande, le sociétaire livre en bidons séparés le lait du matin provenant des vaches de l'une et l'autre race.

A la réception au quai de la laiterie, les pots étiquetés sont séparés des autres. Un litre de lait est prélevé dans chacun des pots étiquetés. On obtient ainsi 25 litres de lait « parthenais » et 25 litres de lait « normand ». Le lait représentant le mélange de tous les échantillons appartenant à chacune des races est bien mélangé puis écrémé. Un litre de chacune des crèmes est prélevé et versé dans une bouteille en verre préalablement stérilisée. Les deux bouteilles sont placées ensuite dans une caisse en bois. Un échantillon du beurre fabriqué la veille à la laiterie y est joint. Les échantillons de crèmes sont transportés (sans refroidissement spécial) l'après-midi à Niort, arrivent le lendemain matin à Paris et sont reçus au laboratoire de Jouy-en-Josas à 9 h du matin (soit 24 h après le prélèvement).

E. — Fabrication du beurre.

Au laboratoire, la crème est maintenue dans la bouteille pendant 24 heures à la température ambiante (20°C). Elle subit ainsi une maturation spontanée.

Après détermination de l'acidité, la crème est versée dans une baratte à main (S. A. M., Paris) et est transformée en beurre. Après lavage et malaxage, un échantillon de chaque beurre est remis au laboratoire du Service Technique de l'Industrie Laitière où est effectué l'examen organoleptique.

F. — Examen organoleptique.

Au cours de l'examen organoleptique les experts examinent et notent successivement le goût et l'odeur du beurre (note maxima 13), la répartition de l'humidité (note maxima 3), l'aspect (note maxima 2) et la texture (note maxima 2). Ils observent en outre et caractérisent la nature des défauts. C'est ainsi qu'ont été notés, toutes les trois semaines, les échan-

tillons de beurre fabriqués au laboratoire auxquels s'ajoutait un échantillon de beurre fabriqué par la laiterie coopérative la veille du jour du prélèvement.

Nous ne retiendrons de cet examen que la note de goût et d'odeur ; les autres notes jugent en effet surtout la qualité de la fabrication, qui, dans les conditions où elle est effectuée n'a que peu de rapport avec la nature même de la crème.

G. — Analyse des échantillons.

Une analyse bactériologique est effectuée sur la crème, juste avant la fabrication du beurre. Elle comporte la recherche des germes totaux (milieu au lait digéré à la papaïne, pH 6,8) des bactéries coliformes (gélose au désoxycholate), des germes caséolytiques (milieu au caséinate de chaux), des moisissures et levures (milieu au lait digéré à la papaïne, mais ajusté à pH 3,5 avec l'acide lactique).

L'analyse chimique comporte la détermination, sur la matière grasse du beurre (obtenue par la fusion du beurre à 60°C suivie d'une centrifugation), de l'indice d'iode, de l'indice de saponification et de l'acidité volatile soluble et insoluble.

III. — RÉSULTATS

A. — Examen organoleptique.

La moyenne de la note de « goût et odeur » pour les vingt-deux examens organoleptiques qui ont été effectués sur les beurres, est de 8,23 pour le beurre « normand », de 8,36 pour le beurre « parthenais » et de 10,42 pour le beurre fabriqué à Echiré la veille du jour du prélèvement. La qualité de conservation du beurre fabriqué industriellement à Echiré est généralement supérieure à celle des beurres fabriqués au laboratoire ; c'est pourquoi la note moyenne de « goût et odeur » des échantillons de beurre « parthenais » et de beurre « normand », est légèrement inférieure à la note correspondante attribuée au beurre fabriqué à la laiterie coopérative.

On ne relève pas de différence sensible entre la qualité organoleptique des deux beurres « parthenais » et « normand ». De plus, lorsque pour une raison ou une autre, un délai assez long (5, 6 ou 7 jours) s'est écoulé entre la fabrication du beurre et l'examen organoleptique laissant apparaître certains défauts de conservation, le beurre « parthenais » comme le beurre « normand » reçoivent une note inférieure, mais toujours voisine ; de même les observations sur les défauts de goût que peuvent présenter les beurres « normand » et « parthenais » sont similaires.

B. — Analyse bactériologique.

Il nous était utile de connaître la qualité bactériologique des crèmes au moment de la fabrication du beurre. En effet, si une différence de qualité organoleptique se révélait à l'examen du beurre, il importait de savoir si la propreté bactériologique pouvait ou non être mise en cause.

1. Germes totaux.

Le nombre de germes totaux varie de $3{,}6.10^7$ à $2{,}0.10^9$ par cm^3 de crème. Les résultats concernant les deux crèmes sont assez voisins mais présentent des fluctuations. Celles-ci ne semblent pas liées aux variations de l'acidité titrable (de 40 à 65° Dornic).

2. Bactéries coliformes.

Leur nombre varie entre les valeurs extrêmes de 2.10^2 (pour une crème parthenaise) et 5.10^6 (pour une crème normande) par cm^3 de crème. Les variations dans le temps, d'un examen à l'autre sont irrégulières mais le plus souvent parallèles pour les crèmes « parthenaise » et « normande ».

On remarque que le nombre de bactéries coliformes pour 1 cm^3 de crème « parthenaise » acide est toujours inférieur au nombre correspondant trouvé pour la crème « normande » également acide. La différence est particulièrement importante au printemps : à cette époque les bactéries coliformes peuvent être mille fois plus nombreuses dans la crème « normande » que dans la crème « parthenaise ».

3. Germes caséolytiques.

Leur nombre varie de 2.10^3 (pour une crème « parthenaise ») à 2.10^6 (pour une crème « normande »). Le nombre de germes caséolytiques contenus dans 1 cm^3 de crème « parthenaise » est toujours inférieur au nombre de ces mêmes germes contenus dans 1 cm^3 de crème « normande », à l'exception de deux crèmes. De même que pour les bactéries coliformes la différence est particulièrement accentuée au printemps (avril, mai).

4. Moisissures, levures.

Ces germes varient de 0 à 4.10^3 par cm^3 de crème. Les variations sont irrégulières ; on note un maximum en mars suivi d'une disparition brusque et passagère, et un second maximum vers la fin d'octobre 1957 suivi également d'une nette diminution.

Les résultats concernant les crèmes « parthenaise » et « normande » sont assez voisins.

A partir de juin 1957, nous avons joint aux échantillons de crèmes destinés à la fabrication du beurre, des échantillons de ces mêmes crèmes

Tableau II

Caractéristiques de la matière grasse des beurres.

Date du prélèvement	Indice de saponification			Acidité volatile						Indice d'iode		
				Soluble			Insoluble					
	Norm.	Parth.	Échiré	Norm.	Parth.	Échiré	Norm.	Parth.	Échiré	Norm.	Parth.	Échiré
11 octobre 1956	223,2	224,2	—	29,7	29,8	—	3,0	3,3	—	44,4	41,8	—
5 novembre 1956	225,1	224,3	224,7	29,0	29,7	29,0	3,0	3,1	3,4	41,6	41,5	43,9
26 novembre 1956	227,2	226,8	226,4	29,4	29,4	29,2	4,0	4,2	3,8	39,5	37,0	41,4
17 décembre 1956	226,1	225,9	226,3	29,3	29,9	29,4	4,0	4,2	4,1	35,5	35,4	34,6
7 janvier 1957	236,5	236,5	237,4	32,1	32,1	31,4	4,8	4,7	4,8	30,9	30,6	30,5
28 janvier 1957	239,4	240,4	238,5	30,8	30,9	30,2	5,1	4,7	4,3	30,6	28,4	28,6
18 février 1957	238,8	237,8	237,6	30,3	30,3	30,6	4,6	5,4	4,5	28,4	25,6	27,5
11 mars 1957	236,0	236,7	236,6	32,0	29,8	30,3	5,1	5,3	4,9	29,9	27,5	28,4
1er avril 1957	237,3	237,4	237,1	31,0	30,5	30,8	5,1	4,9	5,0	32,0	29,4	30,4
22 avril 1957	230,7	231,0	232,3	30,6	30,4	30,0	4,6	4,0	4,1	39,8	37,8	37,7
13 mai 1957	227,8	228,0	227,5	29,4	30,0	29,4	4,0	4,8	4,0	40,6	37,9	38,8
3 juin 1957	227,3	229,9	228,0	29,6	29,4	29,5	4,2	4,5	3,6	38,8	36,9	38,3
24 juin 1957	226,0	226,3	225,8	29,3	28,3	29,3	3,5	3,6	4,0	41,8	39,0	39,9
15 juillet 1957	224,0	223,2	223,2	29,3	28,8	28,9	3,5	3,4	3,7	44,0	41,7	42,5
5 août 1957	223,4	223,6	223,8	29,0	28,5	28,3	2,8	2,7	2,9	42,8	39,6	41,9
26 août 1957	226,0	226,4	225,5	28,9	28,2	28,3	3,2	3,8	3,3	44,1	40,9	41,9
16 septembre 1957	229,2	230,4	229,9	28,9	29,4	28,4	3,3	3,5	3,2	44,8	40,7	42,6
7 octobre 1957	229,8	229,2	229,1	28,8	28,9	28,8	3,2	3,8	3,4	41,7	40,7	41,7
28 octobre 1957	230,4	228,3	229,2	29,9	29,2	29,5	3,7	3,2	3,3	40,0	39,9	39,7
18 novembre 1957	233,8	231,2	231,7	31,0	29,0	30,1	5,0	4,7	4,7	35,4	34,9	36,0
9 décembre 1957	236,6	236,3	236,6	31,4	30,5	30,6	5,1	4,9	5,0	31,2	29,9	30,3
30 décembre 1957	235,5	235,4	235,2	30,8	30,3	30,5	5,2	4,7	5,0	28,9	26,3	26,5

mais expédiés en flacons maintenus dans la glace. Au moment de l'analyse bactériologique ces crèmes avaient une acidité titrable de 10 à 14° Dornic seulement. L'analyse bactériologique des crèmes n'a pas permis de confirmer la différence de qualité bactériologique souvent notée entre les crèmes ayant subi une acidification.

C. — Analyse chimique.

Les résultats de l'analyse chimique sont rassemblés dans le tableau II. Les figures 2, 3, 4 et 5, donnent une représentation graphique des variations saisonnières des différents indices.

Nous examinerons en détail les résultats concernant chacune des caractéristiques de la matière grasse des deux beurres.

1. Indice d'iode (fig. 2).

Dans la zone d'Echiré, comme dans toutes les régions où le régime de stabulation existe, l'indice d'iode est bas l'hiver, élevé en été et au début de l'automne. Il présente un premier maximum au printemps après la mise à l'herbe du troupeau et un second maximum au début de l'automne. L'indice d'iode s'abaisse dès la rentrée des vaches à l'étable. Dans la zone d'Echiré, en 1956, la rentrée à l'étable s'est effectuée du 1er novembre au 15 décembre et en 1957 de fin octobre à fin novembre. L'indice d'iode des beurres étudiés diminue un peu plus tôt en 1957 qu'en 1956. Les valeurs minima atteintes sont très voisines d'une année à l'autre de même que les valeurs maxima. Nous l'avions déjà constaté au cours d'études antérieures (5). Nous relevons cependant une différence sensible entre l'indice d'iode du beurre « normand » et celui du beurre « parthenais » ; le premier est toujours supérieur ou au moins égal au second. Cette différence est particulièrement nette pendant l'été ainsi qu'en février et mars. Toutefois, elle atteint au maximum quatre unités (14 septembre 1957), alors que l'amplitude maxima de variation pour l'ensemble des trois beurres est voisine de vingt unités et égale à 16,2 unités pour les beurres « parthenais » et « normand ». L'indice d'iode du beurre fabriqué par la laiterie d'Echiré est généralement intermédiaire entre l'indice d'iode des beurres « normand » et « parthenais ». La courbe représentative de ses variations au cours de l'année est aussi plus régulière que les courbes représentatives des indices d'iode des deux autres beurres.

2. Indice de saponification (fig. 3).

La courbe représentative des variations de l'indice de saponification présente le mouvement inverse de la courbe représentative des variations de l'indice d'iode. Il est en effet bien connu que l'indice de saponification est élevé l'hiver lorsque la proportion des acides insaturés à haut poids

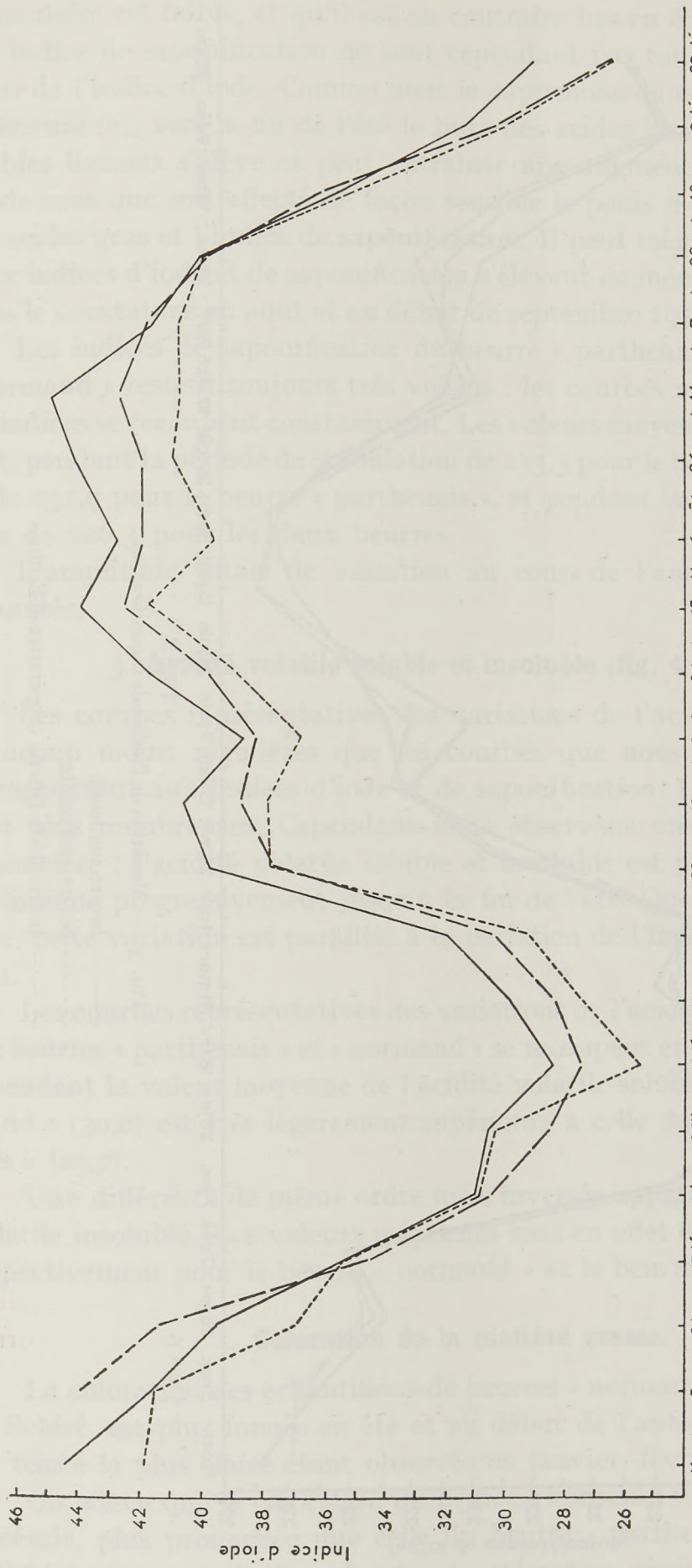


FIG. 2. — Variation de l'indice d'iode.

——— beurre normand.
- - - - - - beurre parthenais.
— — — beurre de la laiterie coopérative d'Echiré.

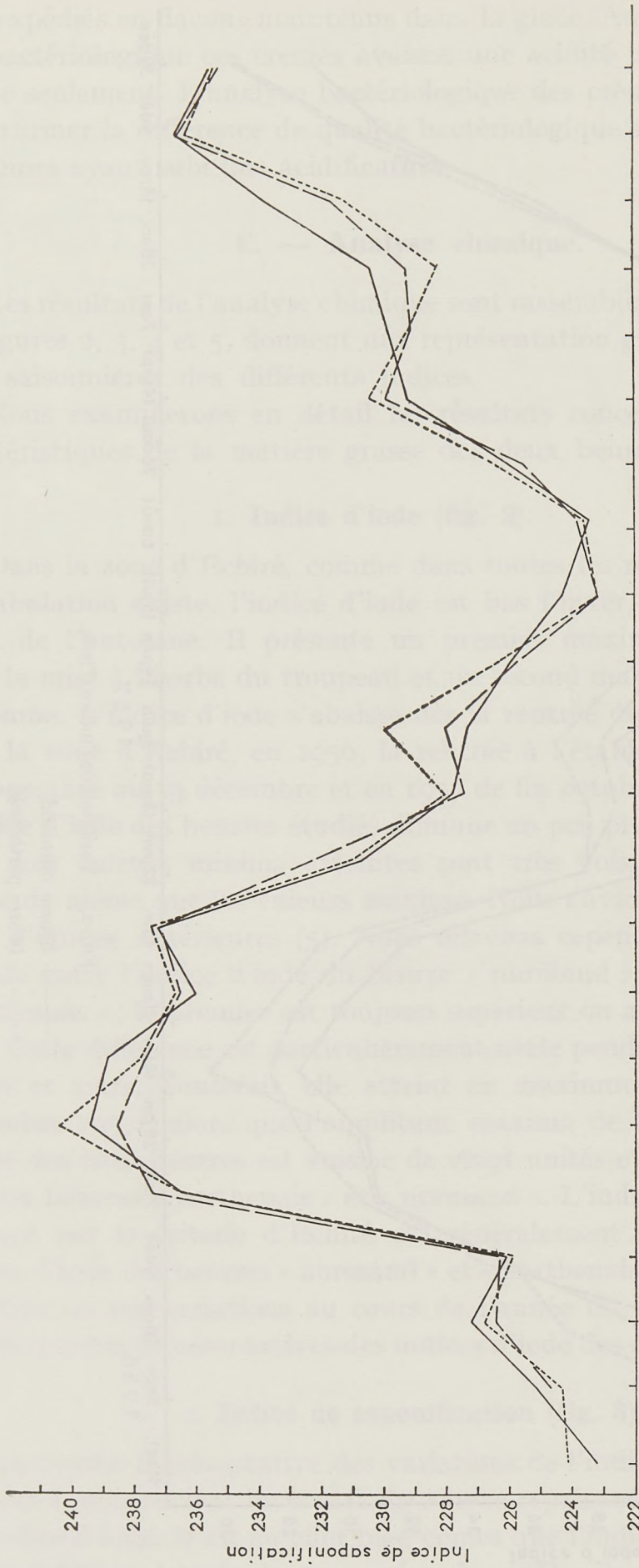


Fig. 3. — Variation de l'indice de saponification.

——— beurre normand.
- - - - - - - beurre parthenais.
— — — beurre de la laiterie coopérative d'Echiré.

moléculaire est faible, et qu'il est au contraire bas en été. Les variations de l'indice de saponification ne sont cependant pas toujours inverses de celles de l'indice d'iode. Comme nous le rappelions dans une publication antérieure (6), vers la fin de l'été le taux des acides insaturés à plusieurs doubles liaisons s'élève et peut entraîner une augmentation de l'indice d'iode sans que soit affecté de façon sensible le poids moléculaire moyen des acides gras et l'indice de saponification. Il peut même arriver que les deux indices d'iode et de saponification s'élèvent en même temps comme nous le constatons en août et au début de septembre 1957.

Les indices de saponification du beurre « parthenais » et du beurre « normand » restent toujours très voisins : les courbes représentatives de ces indices se recoupent constamment. Les valeurs moyennes de ces indices sont, pendant la période de stabulation de 233,3 pour le beurre « normand » et de 232,9 pour le beurre « parthenais », et pendant la période de pâturage de 226,3 pour les deux beurres.

L'amplitude totale de variation au cours de l'année est d'environ 17 unités.

3. **Acidité volatile soluble et insoluble (fig. 4 et 5).**

Les courbes représentatives des variations de l'acidité volatile sont beaucoup moins régulières que les courbes que nous venons d'étudier se rapportant aux indices d'iode et de saponification. Les dents de scie sont plus nombreuses. Cependant nous observons une nette variation saisonnière : l'acidité volatile soluble et insoluble est plus élevée l'hiver et diminue progressivement jusqu'à la fin de l'été. Quoique moins régulière, cette variation est parallèle à la variation de l'indice de saponification.

Les courbes représentatives des variations de l'acidité volatile soluble des beurres « parthenais » et « normand » se recoupent en plusieurs points ; cependant la valeur moyenne de l'acidité volatile soluble du beurre « normand » (30,0) est très légèrement supérieure à celle du beurre « parthenais » (29,7).

Une différence de même ordre mais inversée apparaît pour l'acidité volatile insoluble. Les valeurs moyennes sont en effet de 4,09 et de 4,15 respectivement pour le beurre « normand » et le beurre « parthenais ».

4. **Coloration de la matière grasse.**

La coloration des échantillons de beurres « normand », « parthenais » et Echiré, est plus foncée en été et au début de l'automne qu'en hiver. La teinte la plus claire étant observée en janvier, février, mars.

On relève que la coloration du beurre « normand » est, de façon très générale, plus prononcée que celle du beurre « parthenais ». Le beurre d'Echiré proprement dit, présente une coloration généralement intermé-

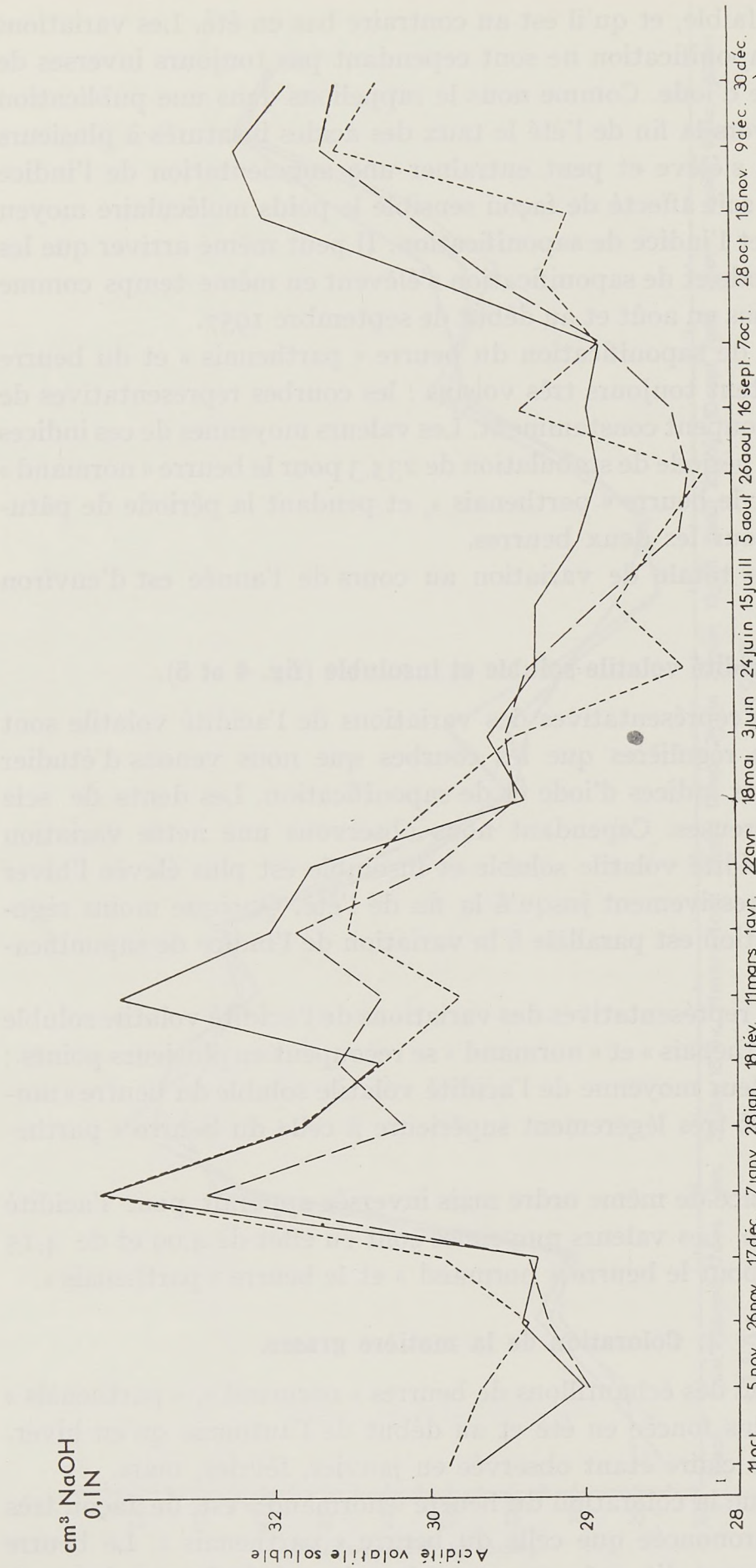


FIG. 4. — Variation de l'acidité volatile soluble.

——— beurre normand.
- - - - - - - beurre parthenais.
— — — beurre de la laiterie coopérative d'Echiré.

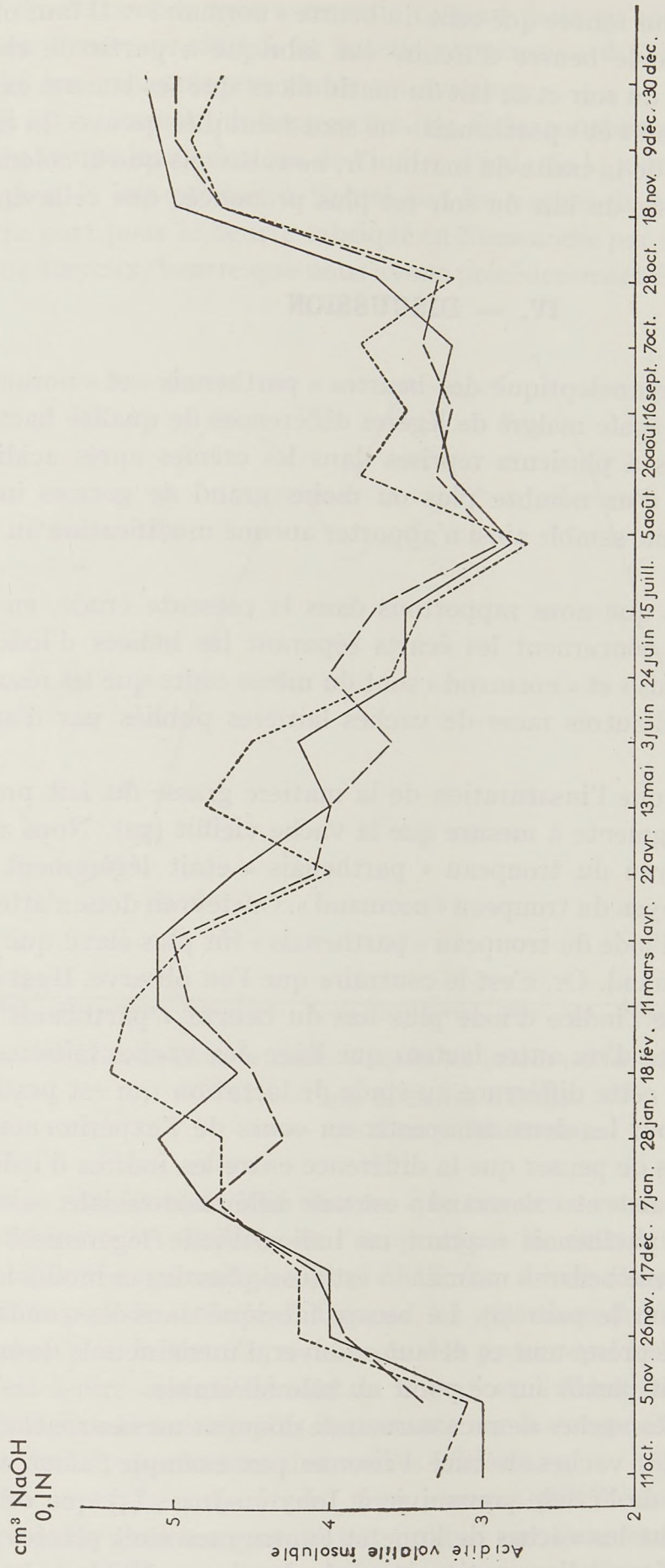


FIG. 5. — Variation de l'acidité volatile insoluble.

——— beurre normand.
- - - - - - - beurre parthenais.
— — — beurre de la laiterie coopérative d'Echiré.

diaire et parfois plus foncée que celle du beurre « normand ». Il faut observer à ce sujet que le beurre d'Echiré est fabriqué à partir de crèmes provenant de lait du soir et de lait du matin alors que les beurres expérimentaux « normand » et « parthenais » ne sont fabriqués qu'avec la crème provenant du lait de la traite du matin. Or, nous savons que la coloration de la matière grasse du lait du soir est plus prononcée que celle du lait du matin.

IV. — DISCUSSION

La qualité organoleptique des beurres « parthenais » et « normand » est pratiquement égale malgré de légères différences de qualité bactériologique constatées à plusieurs reprises dans les crèmes après acidification. La présence d'un nombre plus ou moins grand de germes indésirables dans la crème semble ainsi n'apporter aucune modification au goût du beurre frais.

Les résultats que nous rapportons dans la présente étude, en particulier ceux qui concernent les écarts séparant les indices d'iode des beurres « parthenais » et « normand » sont du même ordre que les résultats se rapportant à d'autres races de vaches laitières publiés par d'autres auteurs.

Il est admis que l'insaturation de la matière grasse du lait produit par une vache augmente à mesure que la vache vieillit (7a). Nous avons vu que l'âge moyen du troupeau « parthenais » était légèrement plus élevé que l'âge moyen du troupeau « normand ». On devrait donc s'attendre à ce que l'indice d'iode du troupeau « parthenais » fût plus élevé que celui du troupeau normand. Or, c'est le contraire que l'on observe. Il est donc vraisemblable que l'indice d'iode plus bas du beurre « parthenais » est sous la dépendance d'un autre facteur que l'âge des vaches laitières. On ne peut attribuer cette différence au stade de lactation qui est pratiquement le même pour les deux troupeaux au cours de l'expérimentation. Il est donc permis de penser que la différence entre les indices d'iode des beurres « parthenais » et « normand » est une différence raciale.

Le beurre « parthenais » ayant un indice d'iode légèrement plus faible en hiver que le beurre « normand » est aussi plus dur et moins facilement tartinable sur le pain (8). Le beurre fabriqué dans les conditions normales à Echiré présentant ce défaut en hiver, l'introduction de la race normande jouerait plutôt sur ce point un rôle favorable.

On sait que les vaches de race normande donnent un beurre toujours plus coloré que les vaches de race Frisonne par exemple ; nous avons montré au cours de l'étude poursuivie à Jouy-en-Josas (4) que ceci est encore vrai lorsque les vaches de l'une et l'autre race sont placées dans les mêmes conditions (alimentation et mode de vie semblables). La pré-

sence des vaches de race normande ne peut donc qu'accentuer la coloration du beurre produit à la laiterie coopérative d'Echiré, ce qui sur le marché français présente plutôt un avantage.

Il est intéressant de rapprocher (fig. 6) les courbes exprimant en fonction du temps les variations de l'indice d'iode de la matière grasse, d'une part pour le lait produit à Echiré par les vaches de race Normande et d'autre part pour le beurre fabriqué en Normandie par la coopérative laitière de Bayeux, beurre que nous avons précédemment étudié (5) pendant

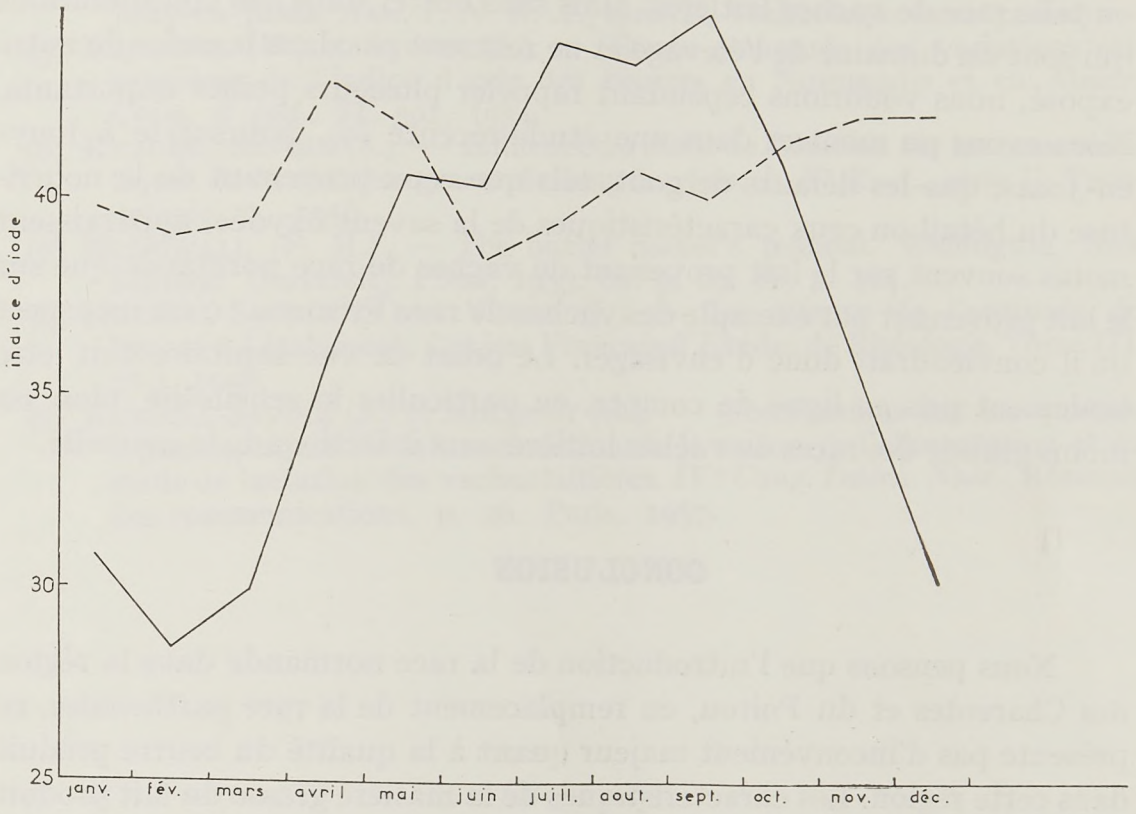


FIG. 6. — Variation comparée de l'indice d'iode du lait produit par les vaches de race normande.
------- zone de Bayeux (Calvados).
——— zone d'Echiré (Deux-Sèvres).

3 années consécutives. On observe que ces deux courbes ont une allure très différente. A Echiré, où l'on pratique la stabulation en hiver, on observe un changement prononcé de l'indice d'iode entre la période hivernale et la période estivale. A Bayeux, les variations de l'indice d'iode sont beaucoup plus faibles. On a donc ainsi la preuve que les conditions de vie — c'est-à-dire essentiellement le climat et l'alimentation — exercent une influence beaucoup plus importante sur la composition de la matière grasse du lait que la race des vaches laitières.

Au cours de cette étude, nous n'avons pas mesuré les dimensions relatives des globules gras du lait produit par l'une et l'autre race. Il se peut qu'une différence existe et il ne faut pas en négliger l'aspect pratique :

en effet, comme l'indique McDowall (7b) le temps de barattage d'une crème à petits globules peut être deux fois plus long que celui d'une crème à globules gras de grandes dimensions. De plus, dans le premier cas, le beurre obtenu est plus dur, sa pâte est plus courte, il se brise plus facilement. Dans le second cas, le beurre est plus mou, sa pâte est plus longue, son empaquetage plus facile. Ce point pourra, éventuellement, former l'objet d'une recherche ultérieure.

Les caractéristiques de la matière grasse ne sont certainement pas les seuls facteurs qui peuvent déterminer le choix des éleveurs pour telle ou telle race de vaches laitières. Mais sans entrer dans des considérations qui sont du domaine de l'élevage et ne rentrent pas dans le cadre de notre exposé, nous voudrions cependant rappeler plusieurs points importants. Nous avons pu montrer dans une étude récente (9), poursuivie à Jouy-en-Josas, que les défauts de goût, tels que ceux provenant de la nourriture du bétail ou ceux caractéristiques de la saveur oxydée, apparaissent moins souvent sur le lait provenant de vaches de race normande que sur le lait provenant par exemple des vaches de race Frisonne ; c'est un aspect qu'il conviendrait donc d'envisager. Le point de vue sanitaire doit être également pris en ligne de compte, en particulier la sensibilité plus ou moins grande des races de vaches laitières aux infections de la mamelle.

CONCLUSION

Nous pensons que l'introduction de la race normande dans la région des Charentes et du Poitou, en remplacement de la race parthenaise, ne présente pas d'inconvénient majeur quant à la qualité du beurre produit dans cette région. Les caractéristiques de la matière grasse du lait produit par les vaches de l'une et l'autre race, restent en effet voisines. De plus les modifications légères susceptibles d'être introduites par l'extension de la race normande présenteraient plutôt un avantage.

Nous insistons cependant sur le point suivant : il est absolument nécessaire de n'introduire en remplacement de vaches parthenaises — si l'éleveur pense y trouver un avantage — que des vaches de race normande sélectionnées inscrites au Herd-Book et présentant toutes les garanties sanitaires voulues.

« Nous remercions Monsieur A. Braud, Directeur de la Laiterie Coopérative d'Echiré, du concours personnel actif et efficace qu'il nous a apporté pendant la durée de l'expérimentation »

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

(1) SWARTLING (P.) and MATTSSON (S.). — On the composition and properties of Jersey milk. Dairy department, Alnarp Institute, Sweden, report n° 47, 1956.

(2) MAYHEAD (J. W.) et BARNICOAT (C. R.). — Variations in iodine value of milk fats. *J. Dairy Res.*, **23**, 238, 1956.

(3) PEDERSEN (A. H.). — Problems in the manufacture of butter from the milk of Jersey cows. *XIII*e *Cong. Intern. Lait. La Haye*, 1953, II, (1), 108.

(4) KUZDZAL-SAVOIE (S.). — Influence de la race des vaches laitières sur la composition de la matière grasse du lait. Expérimentation conduite à Jouy-en-Josas. *Ann. I. N. R. A.*, série E, Technologie (sous presse).

(5) BEJAMBES (M.) et SAVOIE (S.). — Étude comparée des variations saisonnières de l'indice d'iode des beurres en Normandie et en Alsace. *Chim. et Ind.*, **71**, 501, 1954.

(6) KUZDZAL-SAVOIE (S.). — Influence du stade de lactation sur les caractéristiques de la matière grasse du beurre. *Ann. I. N. R. A.*, série E, Technologie, 1, 1956.

(7) MCDOWALL (F. H.). — The butter maker's manual. Wellington, New Zealand University Press, 1953. 8a, p. 69, 8b, p. 414.

(8) KUZDZAL-SAVOIE (S.) et VERGE (J.). — La mesure de l'aptitude du beurre à l'étalement. Cahiers Français d'Etudes de Rhéologie. Tome III, n° 1, 1958.

(9) KUZDZAL-SAVOIE (S.) et MOCQUOT (G.). — Observations sur les qualités organoleptiques du lait en fonction de la saison, de l'alimentation et du stade de lactation des vaches laitières. *IV*e *Cong. Intern. Nutr.*, Résumés des communications, p. 26, Paris, 1957.

CARACTÉRISATION DU TAUX DE FERMENTATION DU RAFFINOSE PAR LES LEVURES PAR CHROMATOGRAPHIE SUR PAPIER

PAR

H. GIRARD et Mlle E. de CHARON

Laboratoire des Levures, Institut Pasteur, Paris.

La recherche du taux de fermentation du raffinose par les levures est un critère déterminant pour la différenciation des espèces au sein des genres. On sait que ce triohloside, formé de lévulose et de mélibiose, ce dernier étant composé de glucose et de galactose, peut être fermenté plus ou moins complètement suivant les espèces de levures. Les unes, après hydrolyse partielle, utilisent seulement la molécule de lévulose (fermentation pour 1/3). D'autres, après hydrolyse du mélibiose, utilisent aussi la molécule de glucose composant ce dernier (fermentation pour 2/3). Certaines enfin sont capables d'utiliser les trois oses (fermentation totale, ou pour 3/3). BRONN (5) distingue encore une fermentation pour 1/3 atypique, quand la levure utilise le galactose sans toucher ni au lévulose ni au glucose qui restent associés sous forme de saccharose.

Plusieurs méthodes ont été proposées pour la mise en évidence de ces types fermentaires. LODDER et K. VAN RIJ (1) emploient l'appareil de VAN ITERSON-KLUYVER quand la levure à caractériser est connue comme pouvant faire fermenter le saccharose. On peut encore déterminer la nature des sucres restant dans le milieu après fermentation par les méthodes biologiques de WICHERHAM (2) ou de SKINNER et BOUTHILET (3) ou par les méthodes biochimiques de Mlle DOMERCQ (4) qui caractérise la présence ou l'absence de sucre réducteur résiduel, ou de BRONN (5), qui fait appel aux réactifs spécifiques du lévulose et du glucose.

Nous utilisons la technique de chromatographie sur papier. Celle-ci a l'avantage de se prêter aux caractérisations en série. Une vingtaine de taches correspondant à une vingtaine d'essais différents peuvent être déposées sur un chromatogramme de 56 × 54 cm. Elle est rapide et sûre. Nous n'avons jusqu'à présent jamais rencontré de résultats difficiles à interpréter.

Le milieu de culture utilisé est l'eau peptonée à 2 p. 100, salée à 0,5 p. 100. Nous avons préféré ce milieu à l'eau de levure, plus classique, mais qui renfermerait du tréhalose (6). Nous employons toujours l'eau peptonée pour effectuer les tests de fermentation des sucres, et nos résultats ont toujours été en accord avec ceux des auteurs qui utilisent l'eau de levure. Le milieu est réparti en tubes de 17 × 17 munis d'une cloche de Durham immergée, puis stérilisé pendant 20 minutes à 120°C. Au moment de l'emploi, on ajoute stérilement une solution aqueuse de raffinose pour obtenir dans le milieu une concentration finale en sucre de 2 p. 100. La solution de raffinose est une solution à 20 p. 100 dans l'eau distillée neutralisée, stérilisée à 110° pendant 15 minutes. Les tubes sont ensemencés avec 5 gouttes d'une suspension de levure dans l'eau stérile, préparée en prélevant une anse de culture à la surface d'un milieu gélosé. L'incubation est faite à 25°C.

Quand la fermentation est bien caractérisée par l'apparition de gaz dans la cloche, et quand elle est terminée, ce qui demande huit à dix jours, on dispose sur la ligne de départ d'un chromatogramme 20 mm³ de milieu fermenté pour constituer une tache. Il n'est pas indispensable d'effectuer une centrifugation préalable.

La technique de chromatographie utilisée est celle décrite par R. Dedonder (7). Le papier est du papier Arches 304. Après séchage, le chromatogramme est disposé dans la gouttière d'un système descendant. Le solvant est un mélange Butanol/Ethanol/Eau (4 : 1,1 : 1,4). Le système reste en place pendant trois jours à température constante après quoi la feuille est enlevée puis séchée. La position des sucres dont la présence est vraisemblable dans le milieu de fermentation est révélée par deux pulvérisations successives de phtalate d'aniline d'une part et d'urée en milieu chlorhydrique d'autre part. Ils apparaissent colorés en brun-orangé ou en vert, et dans l'ordre suivant quand on prend pour base la ligne de départ : raffinose (en vert), mélibiose (en brun-orangé) saccharose (en vert), galactose (en brun-orangé). Les taches révélées sont suffisamment éloignées les unes des autres pour qu'il n'y ait pas de confusion possible. Nous effectuons néanmoins sur chaque chromatogramme un essai de comparaison avec une solution témoin.

L'interprétation des résultats s'exprime de la façon suivante :

Sucre résiduel caractérisé :

Raffinose : pas de fermentation.

Mélibiose : fermentation pour 1/3.

Saccharose : fermentation pour 1/3 (atypique).

Galactose : fermentation pour 2/3.

O : fermentation totale.

(1) Nous remerçions M. R. Dedonder et Mlle E. Jozon pour l'aide matérielle et les conseils qu'ils nous ont donnés et nous donnent pour l'exécution de ce travail.

Les sels et les composés azotés du milieu de culture n'ont jamais gêné cette interprétation.

Nous appliquons cette méthode chromatographique de façon systématique pour l'identification des espèces de levures de notre collection.

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

(1) Lodder et Van Rij (K.). — The Yeast. A Taxonomic Study 1952. North Holland Publish. Co Amsterdam.
(2) Wickerham (L. J.). — Taxonomy of Yeast, tecnic. Bull. nº 1029. U. S. Dpt of Agric. Washington, 1951.
(3) Skinner (C. E.) et Bouthilet (R.). — *J. Bact.*, **53**, 37, 1947.
(4) Domercq (S.). — Etude et classification des Levures de vin de la Gironde. Thèse (Ann. de Techn. de l'I. N. R. A., Paris, 1957). *Ann. de Techn. de l'I. N. R. A.*, **6**, 5 à 58, 139 à 183, 1957.
(5) Bronn (W.). — *Wissensch. beilage Brauerei*, **75**, 156, 1958.
(6) Bouthilet (R. J.), Neilson (N. E.), Mrak (E. M.) et Phaff (H.). — *J. of gene. Microb.*, **3**, nº 2, 1949.
(7) Dedonder (R.). — Glucides et Composés voisins. *Bull. Soc. Chim.*, **19**, 874, 1952.

PECTINES ET MÉTHANOL DANS LES MOÛTS DE RAISIN ET LES VINS

PAR

M. FLANZY et Mme L. BOUZIGUES.

Station centrale de Technologie des produits végétaux, Narbonne

PLAN DU MÉMOIRE

I. — **Objet des travaux.**

II. — **Évolution comparée des substances pectiques et du méthanol.**
- A. — Influence du mode de vinification.
- B. — Influence de la macération à basse température.
- C. — Influence de l'anhydride sulfureux.

III. — **Origine du méthanol.**
- A. — Influence du mode de distillation.
- B. — Autres actions possibles.

IV. — **Résumé et conclusions.**

V. — **Références bibliographiques.**

I. — OBJET DES TRAVAUX.

Dans un mémoire précédent (1), on a indiqué que le taux de pectine diminuait notablement en passant du moût au vin correspondant ; que la dose de méthanol était plus importante dans les vins de macération que dans les vins non macérés, enfin que le méthanol paraissait préformé dans le jus de raisin avant sa fermentation, confirmant ainsi, pour les deux derniers points, les conclusions déjà annoncées par l'un de nous (2).

Deux ans auparavant, des travaux sur le même sujet avaient été menés à bonne fin. Mais certains résultats paraissaient alors si singuliers qu'il nous a paru prudent, avant leur publication, de reprendre ces essais. En particulier, les variations de la dose de matières pectiques, les relations entre la dose de ces matières et celle de CH_3OH nous paraissaient trop irrégulières pour les accepter sans nouveau contrôle.

Cette deuxième série de recherches a bien confirmé les résultats antérieurs quant à l'évolution globale des matières pectiques, la production de CH_3OH. En conséquence, ces résultats ne seront pas publiés car on répéterait, en grande partie, le mémoire déjà paru. Par contre, des points originaux, tels que le détail de l'évolution des pectines et du méthanol au cours de la vinification, l'influence du temps de macération, de la température, les effets de la distillation sur la dégradation possible des pectines, autant de chapitres originaux qui avaient été traités alors. Les résultats obtenus font l'objet du présent mémoire.

Les techniques analytiques utilisées ont été les suivantes :

Pour les *pectines* la méthode Semichon-Flanzy (3) ; toutefois les filtres ont été remplacés par des creusets filtrants de porosité 4. Les résultats obtenus sont exprimés en mg de pectate de Ca.

Le *méthanol* a été déterminé par la méthode colorimétrique mise au point par l'un de nous (4).

II. — ÉVOLUTION COMPARÉE DES MATIÈRES PECTIQUES ET DU MÉTHANOL

A. — Influence du mode de vinification sur l'évolution des pectines et du méthanol.

Les essais ont porté sur un moût de Malbec (Vitis Vinifera), vinifié en blanc et sur un moût d'Hybride Seyve-Villard 12 417 vinifié en rouge. Les fermentations ont été régulières et ont duré 7 jours. On a dosé les substances pectiques et le méthanol au départ (temps 0), au bout de 2 jours, après 5 jours, et enfin, après 7 jours (fin de fermentation).

Les résultats obtenus sont consignés dans le tableau I.

Tableau I

Évolution des pectines et du méthanol en fonction du temps pendant la vinification.

	Densité	Mat. Pectiques mg/litre	Méthanol mg/litre
Moût Malbec :			
(Vinifié en blanc)			
Densité au départ	1 083,6	370	52
Après 2 jours	1 037,3	580	51,9
Après 5 jours	1 010	300	51,3
Après 7 jours	1 000	250	52
Moût Hybride 12 417 :			
(Vinifié en Rouge)			
Densité au départ	1 088,7	270	400
Après 2 jours	1 073,6	780	425
Après 5 jours	1 010,7	500	490
Après 7 jours	996,1	480	500

Les résultats obtenus montrent, d'une part, une augmentation appréciable du taux de méthanol en fonction du temps de macération, d'autre part, une augmentation suivie d'une rapide diminution des matières pectiques.

On constate, en outre, que *dans le cas du Malbec vinifié en blanc*, la teneur en méthanol pendant la fermentation reste constante. Quant à la quantité de méthanol de l'Hybride 12 417 vinifié en rouge, elle croît légèrement pendant la fermentation. D'après ces deux exemples, l'évolution du méthanol paraît due plus aux différents modes de vinification qu'à la fermentation alcoolique elle-même.

Dans le cas de la vinification en rouge, l'augmentation du méthanol peut s'expliquer de la façon suivante : les matériaux solides du raisin apportent à la fois des matières pectiques, comme nous l'avons d'ailleurs constaté, et une quantité de pectine-méthylestérase plus élevée, fixée sur ces parties insolubles d'après WILLEMAN et HILLS (5). La dissolution des constituants pectiniques n'est pas instantanée ; on conçoit alors que la dose de CH_3OH qui en dérive soit progressive.

Quel que soit le mode de vinification adopté, la teneur en matières pectiques croît, passe par un maximum, et décroît. Cela s'explique par la concomitance de deux phénomènes : d'une part, une dissolution de pectines issue des matières solides, et d'autre part, décomposition de ce constituant.

B. — Influence de la macération à basse température.

Nous sommes partis d'un lot de raisins « Olivette » (Vitis Vinifera) que l'on a écrasé et bien mélangé. Voici les opérations effectuées ensuite :

1° On a prélevé aussitôt une partie du jus (Mo) pour dosage des matières pectiques et du méthanol. Une autre partie du jus a été soumise à la fermentation alcoolique et a donné le vin Vo. Enfin, une autre partie, accompagnée de la rafle, des pépins, et des pellicules correspondantes, c'est-à-dire des constituants solides, a été également soumise à la fermentation alcoolique et a donné le vin de macération Vmo.

Tout le reste a été abandonné au frigorique à + 3°C où allait se poursuivre une macération à froid plus ou moins prolongée.

2° Au bout de 6 jours on a prélevé les quantités nécessaires de jus pour y doser pectines et CH_3OH. Ce fut l'essai M_6 ; 200 ml de ce jus ainsi que 200 autres ml accompagnés des matériaux solides correspondants furent soumis à la fermentation alcoolique. Ce furent respectivement les échantillons V_6 et Vm_6.

3° Au bout de 12 jours on a répété ces mêmes opérations. On a eu les échantillons : M_{12}, V_{12} et Vm_{12}.

4° Le lot restant a donné après 17 jours, le Jus M_{17}.

Les fermentations se sont déroulées à une température de 21° C et ont duré, d'une façon très générale, 6 jours. Méthanol et matières pectiques ont été dosées dans les vins après la fin des fermentations alcooliques.

Le tableau II résume les résultats trouvés.

TABLEAU II

Comparaison entre l'évolution des pectines et du méthanol.

	Mat. Pectiques mg/litre	Méthanol mg/litre
M_0	1 800	18
M_6	2 550	70
M_{12}	730	90
M_{17}	600	100
V_0	710	112
V_{12}	590	20
Vm_0	590	82
Vm_6	710	102

Avant de commenter ces résultats, rappelons que les échantillons M sont des jus ayant macéré à froid avec les pellicules, pépins et rafles constitutifs. Les échantillons V sont ces jus macérés à froid et fermentés en dehors des matériaux solides. Les échantillons Vm sont les jus macérés à froid mais fermentés avec ces mêmes matériaux.

Évolution des Pectines.

Pour les échantillons M on remarque une augmentation très sensible de la dose de pectines puis une diminution. La dose finale est inférieure à la dose initiale. Ces résultats commandent de nouvelles recherches.

Les échantillons V accusent la diminution constatée dans d'autres essais. Cette évolution des pectines au cours de la fermentation alcoolique est bien un phénomène général indiscutable.

Les échantillons Vm n'offrent aucune particularité marquante.

On peut s'étonner de ne pas trouver une quantité plus grande de pectines.

Il faut souligner toutefois que le dosage a apprécié non pas les matières précipitables par l'alcool mais seulement la pectine transformable en acide pectique.

Il est certain que lorsqu'on appliquera au dosage des matières pectiques et gommes des méthodes sélectives et précises une explication satisfaisante pourra être trouvée.

Évolution du méthanol.

Avec les échantillons M on note un enrichissement net en CH_3OH. La dose de 100 mg/l doit être voisine du maximum possible ; 12 jours de macération à + (3°c) sont nécessaires pour atteindre cette dose, apparemment limite, de 100 mg.

La fermentation de ces jus ne modifie pas sensiblement la dose de CH_3OH. Toutefois, on note une légère augmentation, trop faible pour accuser une influence positive de la fermentation alcoolique.

Les échantillons Vm marquent bien l'influence de la macération alcoolique. Celle-ci permet d'atteindre plus rapidement la dose limite de 100 mg.

Ces essais ont été repris avec un autre Vitis Vinifera, le Carignan, cépage de base d'une grande partie du vignoble méridional. Les résultats ont été identiques aux précédents. Il nous paraît inutile de les noter.

C. — Influence de l'anhydride sulfureux.

Il était intéressant de préciser l'action de l'anhydride sulfureux régulièrement utilisé en vinification et dont le rôle dissolvant est bien connu depuis longtemps. Une autre raison justifiait ces recherches, la généralisation de la technique de « sulfitation-désulfitation » pour l'élaboration des Jus de Raisin.

On a mis en comparaison :

— Le jus ordinaire conservé en frigorifique à 0°C pendant 13 et 22 jours. Ce sont les échantillons Mo, M13, M22.

— Le jus identique sulfité avec du métabisulfite de potassium à raison de 150 g par hl de moût, et dans lequel macèrent les matériaux solides correspondants, rafle, pellicules, pépins. Cette macération a duré 13 et 22 jours. Ce sont les échantillons Ms13 et Ms22.

— Les vins élaborés à partir de jus identiques aux jus Mo, M13, M22. Ce sont les échantillons Vo, V13, V22.

— Enfin, les vins de macération résultant de la fermentation du moût ordinaire avec les matériaux solides correspondants. Ici encore la macération a été prolongée 13 et 22 jours. On a obtenu ainsi les échantillons Vmo, Vm13, Vm22. Il faut remarquer qu'ici il s'agit de macération « hydro-alcoolique » et non pas sulfureuse. On pourra donc comparer l'effet « sulfureux » à l'effet « hydroalcoolique ».

Les résultats obtenus sont inscrits dans le tableau III.

L'ensemble des doses trouvées permet de déduire que dans cet essai la dose optima de CH_3OH doit être voisine de 130 mg (jus macéré et jus macéré fermenté).

On voit alors que pour un temps donné la dose de CH_3OH est plus

élevée dans le cas de macération sulfureuse que dans le cas de macération à froid. La déméthoxylation serait donc plus rapide en présence de SO_2.

TABLEAU III

Évolution du méthanol dans le Carignan sous l'influence de la macération à froid, alcoolique et sulfureuse.

Echantillon	Méthanol mg/litre
M o	50
M 13	88,8
M 22	105,8
Ms 13	126
Ms 22	128
V o	51,5
V 13	104
V 22	112
Vm o	117
Vm 13	127,6
Vm 22	128

Ceci confirme les travaux de KERTESZ (6) qui note que le bisulfite de Na augmente l'activité de la pectine-méthylestérase. Cet auteur a encore constaté que la réaction de déméthoxylation n'est pas complète et s'arrête quand la teneur en méthoxyle est de l'ordre de 0,50 p. 100 (7),

L'ensemble de ces résultats démontre bien que la déméthoxylation n'est pas un phénomène lié à la fermentation alcoolique. De plus, et malgré les travaux de l'un de nous (8) certains ont pu penser qu'en dehors d'une explication enzymatique de cette présence les traitements imposés au jus peuvent avoir une influence marquée. C'est la raison des recherches suivantes.

III. — ORIGINE DU MÉTHANOL

En dehors de la déméthoxylation sous l'influence de la pectine-méthylestérase on peut se demander si d'autres facteurs n'ont pas un effet sensible.

A. — Influence du mode de distillation.

La déméthoxylation peut-elle être provoquée par le mode de distillation précédant le dosage de ce corps? A cet effet nous avons :

1° Distillé à la pression ordinaire de 76 cm de Hg, 50 ml de moût auxquels nous avions ajouté 20 ml d'eau. On a recueilli 56 ml. Le méthanol est dosé sur ce distillat.

2° Répété cette distillation mais sous vide (pression 5 mm de Hg) et dosé le méthanol dans le distillat.

3° Ajouté au résidu précédent 56 ml d'eau et distillé à la pression ordinaire. On recueille 56 ml sur lesquels on dose le méthanol.

Pour se rendre compte des pertes d'alcool possibles sous vide, nous

avons comparé les résultats obtenus en distillant sous vide et sous pression ordinaire une solution témoin contenant 100 mg/l de méthanol et 10 p. 100 d'alcool éthylique.

Les pertes sont pratiquement nulles. Elles n'excèdent pas les erreurs opératoires.

Les essais avec le jus de raisin ont été faits en double. Ils ont donné les résultats inscrits dans le tableau IV.

TABLEAU IV

Influence de la température de distillation sur la production de méthanol.

Modalités	N° des essais	Méthanol mg/litre
Distillation à pression ordinaire ; T : 100°C	1	36
	2	34
Distillation sous pression réduite ; T : 25°C	3	35
	4	32
Distillation des résidus des 3 et 4	5	0
	6	0

Il apparaît nettement que les températures appliquées ne provoquent aucune différence significative. Nos travaux antérieurs se trouvent ainsi, sur ce point, bien confirmés (9).

On pourrait conclure qu'il n'existe aucune matière génératrice susceptible de libérer du CH_3OH entre 25° et 100°C. Toutefois, il n'est pas interdit de penser que sous une action enzymatique se déroulant à une température convenable, inférieure par exemple à 50°C le résultat aurait été différent. Cette expérience reste à faire.

De toute façon, et en conclusion pratique, le chauffage ne provoque pas une production appréciable de CH_3OH. La dislocation de la molécule pectique est sous la dépendance d'autres facteurs que ce facteur physique. Cette conclusion confirme bien les résultats obtenus déjà par l'un de nous (10).

Cette recherche a été reprise d'une autre façon.

Un moût de raisin de Noah titrant 200 mg de CH_3OH par litre a été traité pour en éliminer les pectines par précipitation alcoolique suivant la méthode habituelle, les pectines (0,500 g/litre) ont été séparées et lavées puis mises en suspension aqueuse, acidifiée par l'acide tartrique jusqu'à pH 3. La solution obtenue a été distillée à pression ordinaire, comme pour le dosage du méthanol dans ce milieu. Sur 200 ml subissant la distillation rectification 50 ml ont été recueillis. La recherche et le dosage du méthanol a été effectuée sur ce distillat. On a trouvé seulement des traces à peine appréciables.

On peut donc dire qu'en l'absence de toute macération le méthanol apparaît dès l'expression du jus de raisin. Les matières pectiques subissent aussitôt et rapidement l'action d'une pectine-méthylestérase.

B. — Autres actions possibles.

Existe-t-il des corps générateurs autres que les pectines?

WINDISCH (11) ayant trouvé 100 mg de HCO_2H dans le moût de raisin et 280 mg par litre dans le vin et ce résultat étant confirmé par HENNIG et WILLFORTH (12), on a pensé que, sous l'effet de la fermentation alcoolique et par analogie avec CH_3CO_2H, une certaine quantité de HCH_2OH pourrait être élaborée à partir de HCO_2H. En fait, CH_3CO_2H et HCO_2H ne sont guère assimilables par suite des propriétés exceptionnelles de HCO_2H et, en particulier, des propriétés réductrices. Avec cette réserve, l'expérience a été faite.

On a préparé une solution synthétique fermentescible contenant 150 g de glucose, 150 mg de HCO_2H acidifiée en plus par l'acide tartrique à pH 3,00 et ensemencée par une goutte de culture de S. Ellipsoidus. La fermentation terminée on a recherché et dosé CH_3OH.

On a trouvé des traces de CH_3OH trop insuffisantes pour en déduire une relation quelconque entre HCO_2H et HCH_2OH ce qui était prévisible.

IV. — RÉSUMÉ ET CONCLUSIONS

Les résultats obtenus peuvent être ainsi classés :

1° Il n'y a aucune proportionnalité dans un milieu donné entre les matières pectiques et le méthanol dosés.

2° Les irrégularités constatées ne pourront être discutées que lorsqu'on pourra doser correctement l'ensemble des matières pectiques.

3° Le méthanol est un constituant normal des jus de raisin : d'autres travaux sur d'autres jus de fruits permettent de généraliser cette constatation à tous les jus de fruits.

4° Les jus de macération sont plus riches en cet alcool que les jus ordinaires. L'enrichissement est fonction, dans une première phase, de la durée de la macération. Ensuite le maximum n'est pas dépassé quelle que soit la durée ultérieure de la macération.

5° La fermentation alcoolique ne modifie pas ou très peu les doses initiales de méthanol.

Tous ces faits nous permettent d'établir le schéma de ce qui paraît se passer au cours de l'élaboration des vins.

Tout d'abord, dès l'expression du jus, celui-ci subit une déméthoxylation à peu près totale sous l'influence vraisemblablement unique de la pectine-méthylestérase, ou d'une simple hydrolyse aqueuse si le milieu contient un ester méthylique facilement hydrolysable, ce qui n'a pas été constaté jusqu'à présent. On aboutit ainsi à l'acide pectique suivant le schéma proposé dans un précédent mémoire (13).

Ensuite, et dans le cas de macération seulement, le milieu, aqueux d'abord, de plus en plus alcoolique ensuite, dissout peu à peu des principes pectiques avec libération concomitante ou postérieure de méthanol. Jusqu'à quel point macération aqueuse et macération hydro-alcoolique participent-elles finalement à cette dissolution de matières pectiques et libération de méthanol? Ceci n'a pas été établi. Mais il semble, en définitive, que la fermentation alcoolique elle-même soit sans effet sur cette production méthylique. On rejoint ici les conclusions de G. BERTRAND et L. SILBERSTEIN (14) en opposition avec celles de l'un de nous (15). Il serait intéressant de trouver une explication à ces contradictions. La différence fondamentale entre les techniques de dosage utilisées en est peut-être la cause.

Reçu pour publication le 26 janvier 1958.

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

(1) FLANZY (M.) et LOISEL (Mlle Y.). — Evolution des pectines dans les boissons et production de méthanol. *Ann. Tech.* I. N. R. A., Série E, **3**, 311-321, 1958.
(2) FLANZY (M.). — L'alcool méthylique dans les liquides alcooliques naturels. Thèse Sciences, Toulouse, 1934.
(3) SEMICHON (L.) et FLANZY (M.). — Sur la constitution et le dosage des pectines et des gommes dans les vins et les moûts de raisin. *Ann. Fals. Fraudes*, **20**, 395, 1927.
(4) BOUZIGUES (Mme L.). — Sur le dosage du méthanol en présence d'éthanol par électrophotométrie. *Ann. Techn.* I. N. R. A., **2**, 223-234, 1955.
(5) WILLEMAN (J. J.) et HILLS (C. H.). — U. S. pat. **2**, 358-429, 1944.
(6) KERTESZ (Z. I.). — The pectic substances, p. 369, New York, London, Intersc. Publi. Edit. 1951.
(7) KERTESZ (Z. I.). — *op. cit.*
(8) (9) (10) FLANZY (M.). — *Op. cit.*
(11) WINDISCH (K.). d'après FROLOV-BAGREEV (A.) et AGABALIANTZ (G.). — Chimie du Vin, Moscou, 1951.
(12 *a* HENNIG (K.) et WILLFORTH (F.). — Die Aromastoffe der Weine. — *Vorratspfleg u. Lebensmtlforsen*, **5**, 181-199, 313-330, 1942.
b HENNIG (K.). — Les substances de l'arôme des vins. Nouveaux procédés de détermination de la qualité des vins. *Bull. Off. Int. du Vin*, **16** (158), 15, 1943.
(13) DOREE (CH.). — Les méthodes de la Chimie de la cellulose. Dunod. éd., 1949.
(14) BERTRAND (G.) et SILBERSTEIN (L.). — La fermentation du sucre par la levure produit-elle normalement du méthanol? *C. R. Ac. Sci.*, **230**, 800-803, 1950.
(15) FLANZY (M.). — *Op. cit.*

DOSAGE DE L'ACIDE MALIQUE DANS LES MOUTS ET LES VINS

PAR

R. CORDONNIER et C. BIZEAU

Station de Technologie Agricole,
Centre de Recherches agronomiques du Midi,
École Nationale d'Agriculture, Montpellier.

PLAN DU MÉMOIRE

Introduction.

I. — Méthodes faisant appel à des moyens de séparation chimiques.
Méthode FERRE.
Méthode PEYNAUD.
Méthodes polarimétriques, colorimétriques.

II. — Méthodes de dosage utilisant des procédés de séparation physico-chimiques.
A. — Chromatographie :
1° Chromatographie sur papier.
2° Chromatographie sur gel de Silice.
3° Chromatographie sur Célite.
B. — Échangeurs d'ions :
1° SHENKER et RIEMAN.
2° FENECH.
3° GOODBAN et STARK.
4° BUSCH, HURLBERT et POTTER.

Conclusion.

INTRODUCTION

Au cours d'essais entrepris au Laboratoire, il est apparu que les méthodes de dosage de l'acide malique utilisées en œnologie, présentaient certaines difficultés et restaient assez peu précises.

Nous avons donc, sur les conseils du Pr NÈGRE, recherché si, parmi les nombreuses méthodes proposées par les biochimistes, certaines ne seraient pas susceptibles d'adaptation au cas particulier de l'analyse

des moûts et des vins et aussi de simplification suffisante pour permettre le travail de série.

Cette étude, actuellement en cours, a été pour nous l'occasion de rassembler une documentation dont nous donnons ici l'essentiel.

Dans cette mise au point, les méthodes de dosage de l'acide malique ont été classées en fonction des moyens de séparation mis en œuvre pour isoler cet acide. C'est en effet dans ce problème de l'isolement de l'acide que réside une des difficultés majeures du dosage.

Voyons d'abord les méthodes faisant appel à des moyens chimiques de séparation.

I. — MÉTHODES FAISANT APPEL A DES MOYENS DE SÉPARATION CHIMIQUES

Ce sont les plus anciennes et l'on pourrait dire les méthodes « classiques » de dosage. Elles sont basées sur la précipitation différentielle des acides du vin par un métal lourd ou alcalino-terreux, le plus souvent en milieu alcoolique.

Le plus ancien de ces dosages est celui proposé par Girard et Lindet (1) où l'acide malique est précipité sous forme de malate de plomb.

Une étude très complète des divers réactifs utilisables pour ces précipitations a été faite par Dutoit et Duboux (2) qui les combinent à des mesures conductimétriques.

Parmi les auteurs qui se sont intéressés à ce problème, citons encore Laborde (3) (Précipitation du malate de chaux par l'acide acétique) Mestrezat (4) qui appliqua le premier l'oxydation par le permanganate à ce dosage et parmi les auteurs étrangers, Von der Heide (5) et Bonifazi (6).

Récemment, une méthode a été proposée par Gruhman et Gelbert (7) où l'acide malique est précipité par l'argent en milieu alcoolique.

Pour les vins rouges, les tanins sont éliminés par échange d'ions. Il semble que cette méthode doit être peu spécifique : les sels d'argent de presque tous les acides du vin sont précipités plus ou moins facilement par l'alcool (le nombre d'auteurs cités montre la difficulté du problème et l'insuffisance des résultats obtenus).

Nous nous arrêterons davantage sur les méthodes Ferre et Peynaud qui sont les plus utilisées.

Méthode Ferre (8).

A. — **Principe** : Les sels de Baryum des acides malique, tartrique et citrique sont insolubles dans l'alcool à 66° et solubles dans l'eau. On précipite donc les acides du vin sous forme de sels de Baryum ; une

première filtration élimine ceux qui sont solubles sous cette forme en particulier le lactate ; une deuxième filtration, après dissolution dans l'eau permet d'obtenir les acides malique, tartrique et citrique dans ce filtrat. L'alcalinité des cendres de ce dernier est égale à la somme acides malique, tartrique et citrique. Il faut retrancher de cette somme les deux autres acides déterminés par des dosages séparés, ce qui complique beaucoup le dosage lorsque l'acide malique est seul intéressant à connaître et diminue la précision de la méthode puisque les erreurs absolues commises sur les dosages des acides citrique et tartrique s'ajoutent à celles commises sur la détermination de l'alcalinité des cendres.

B. — **Critique** : Un certain nombre d'études ont été publiées sur cette méthode. VENTRE (9) a montré que dans les vins eudémysés, il y a une quantité importante d'acide gluconique qui était comptée comme acide malique dans le dosage. On a montré également que du lactate était retenu par adsorption sur le précipité colloïdal de malate. On pense également que le malate n'est pas totalement insoluble dans les conditions décrites plus haut (10). Au total, si le principe de la méthode est simple, sa réalisation se heurte à de nombreuses difficultés : sa longueur (10 h environ) qui provient surtout des filtrations, le manque de précision obligatoire de certaines mesures de volume.

Méthode Peynaud (11).

La précipitation de l'acide malique s'y fait également par le Baryum en milieu alcoolique mais le précipité ainsi formé est entraîné par l'eau bouillante, débarrassé du Baryum par l'acide sulfurique et oxydé par le Permanganate en Acétaldéhyde, lequel est dosé par l'iode selon la méthode de JAULMES et ESPEZEL (12).

L'erreur sur le dosage de l'acide malique ne dépasse pas, selon l'auteur, 2 milli-équivalents par litre.

La difficulté de la méthode réside dans ce que l'oxydation n'est quantitative que dans des conditions très précises (10) et pas toujours faciles à réaliser. De plus, comme dans le cas de la méthode précédente, le précipité obtenu par le Baryum contient non seulement l'acide malique mais aussi d'autres acides dont certains comme les acides tartrique et citrique sont également oxydés, ce qui oblige à les doser par ailleurs afin d'introduire un facteur correctif proportionnel à leur concentration. D'après PEYNAUD, les autres corps pouvant accompagner ces 3 acides (tanins, autres acides) n'interfèrent pas dans le dosage.

Cependant, la méthode nous a donné constamment des résultats supérieurs à ceux de la méthode FERRE.

Autres méthodes.

Divers modes de séparation ont été utilisés pour permettre des dosages par polarimétrie ou colorimétrie.

1° Dosages polarimétriques.

Mathiez et Ramuz (13) ont préconisé une méthode de dosage basée sur le pouvoir rotatoire des sels molybdiques de l'acide malique (14). Le pouvoir rotatoire de ces sels en solution est fonction de la concentration en molybdate d'NH_4 · il est donc nécessaire de travailler dans des conditions standard.

Les tanins doivent être éliminés (acétate de Zinc), les sucres également (Baryte) ainsi que l'acide tartrique. Le dosage établi sur ce principe par Mathiez et Ramuz semble long et complexe ; ces auteurs donnent comme précision $\pm$ 0,1 g/l, ce qui correspond à peu près à celle des deux méthodes précédentes.

Tanner et Rentschler (15) simplifient la séparation de l'acide malique par emploi d'échangeurs d'ions.

Cette technique de purification donne déjà une idée de l'utilisation des échangeurs d'ions en chimie analytique.

Nous développerons leurs possibilités dans le paragraphe sur l'échange d'ions chromatographique.

Hennig et Burkhardt (16) et Almeida (17) utilisant également la méthode polarimétrique, ont tourné la difficulté de la séparation des acides du vin en transformant quantitativement l'acide malique en acide fumarique (par traitement à la soude à 120-130°) ; le dosage serait « relativement rapide et rigoureux ». Le vin ne doit pas contenir plus de 10 g/l de sucre.

Semichon et Flanzy (18) débarrassent le vin de l'acide tartrique par le racémate puis dosent polarimétriquement l'acide malique après formation d'émétique, à l'aide d'une solution d'oxalate de Potasse et d'Antimoine. L'acide citrique ne gêne pas. On ne parle pas de l'influence des autres corps. La précision n'est pas indiquée.

Un inconvénient de ces méthodes paraît être que le dosage est gêné par la présence, dans le milieu, de sucres en quantité importante ; or, il est bon de pouvoir disposer d'une méthode de dosage unique pour les moûts et les vins.

2° Dosages colorimétriques.

Brunel (19) décrit pour les matières végétales, un microdosage colorimétrique basé sur la coloration obtenue en dissolvant dans la pyridine, le produit de condensation de la dinitrophenylhydrazine et d'un dérivé bromé de l'acide malique.

La séparation est faite par extraction à l'éther et entraînement du dérivé Bromé volatil.

La méthode telle qu'elle est décrite comprend une extraction compliquée. Mais dans le cas du vin, il serait peut-être possible de la simplifier. L'auteur n'indique pas la précision obtenue.

L'acide malique présente en outre de nombreuses réactions colorées que l'on pourrait essayer d'utiliser ou que l'on utilise pour un dosage colorimétrique :

Réactions à l'α-naphtol ou à la résorcine (cités par GRIGNARD (20)), au β-naphtol EEGRIWE (21) ; ou 2,7 naphtalènediol (22).

Malheureusement, elles sont peu spécifiques et réclament donc tout d'abord que l'acide malique ait été bien isolé, cependant NITSCHKE (23) a mis au point, un dosage colorimétrique sans séparation préalable de l'acide malique : en voici le principe : l'α'-naphtol donne en milieu sulfurique concentré une coloration jaune avec l'acide malique ; cette couleur est extraite par l'alcool isooctylique ; on la remet en solution aqueuse en milieu alcalin avec $CO_3Na\,H$.

Cette méthode est évidemment rapide mais on peut se demander si de nombreux constituants du vin ne sont pas susceptibles d'interférer dans le dosage.

En résumé, la recherche de méthodes purement chimiques de dosage n'a guère abouti, en œnologie qu'à deux méthodes utilisées dans la pratique courante de Laboratoire et ces dernières, pour les raisons que nous avons indiquées, ne sont pas sans inconvénients. On obtiendrait peut-être des résultats intéressants en reprenant le dosage polarimétrique après un fractionnement des acides du vin par chromatographie.

Voyons maintenant un deuxième groupe de méthodes utilisant des procédés de séparation physico-chimiques.

II. — MÉTHODES UTILISANT DES PROCÉDÉS DE SÉPARATION PHYSICO-CHIMIQUES

On arrive aujourd'hui à bien séparer des corps très voisins grâce à la chromatographie et à l'emploi de résines échangeuses d'ions. Ce sont ces techniques qui ont été mises à contribution pour la mise au point des méthodes que nous allons maintenant décrire. Chacune des techniques citées ci-dessous a suscité un grand nombre d'études et de publications. Nous ne citerons pour chacune d'elles que le travail d'origine et parmi les variantes, la plus récente ou celle qui nous paraît la plus susceptible d'application quant au dosage qui nous intéresse ; celui de l'acide malique.

A. — Méthodes utilisant la chromatographie.

1° Chromatographie sur papier.

d'après MACHEBOEUF, CHEFTEL et MUNIER (24)
et RIBEREAU-GAYON P. (25).

C'est une méthode semi quantitative, basée sur la technique de MACHEBOEUF. Le solvant est le butanol normal ou le propanol et l'eau mais pour obtenir une bonne séparation des acides du vin qui sont ionisés et formeraient des traînées, on doit abaisser fortement le pH du milieu à l'aide d'acide formique.

La révélation se fait avec un indicateur coloré (bleu de bromophénol), il faut avant la révélation chasser l'acide formique ; pour ce faire, le solvant a été additionné d'Eucalyptol qui en s'évaporant entraîne l'acide formique. A la révélation, le chromatogramme se présentera en bleu avec des taches jaunes correspondant aux divers acides, on aura dans l'ordre en partant du spot de départ, l'acide tartrique, l'acide citrique puis l'acide malique, l'acide lactique, et enfin l'acide succinique peu ou mal séparé de l'acide lactique.

La méthode est semi-quantitative, elle ne donne en effet qu'une valeur approchée de la teneur du vin en acide malique en comparant l'importance de la tache due à cet acide avec une tache témoin correspondant à une quantité donnée de l'acide. Pour l'œnologue, elle a pourtant l'avantage de lui permettre de reconnaître de façon rapide et simple, une fermentation malo-lactique et l'état d'avancement de celle-ci.

2° Chromatographie sur gel de silice.

C'est la technique d'ISHERWOOD (26) utilisée en particulier par BULLEN et coll. (27), Geneviève JOLCHINE (28), ROBERTS et MARTIN (14) et BOVE et RAVEUX (29).

Le gel de silice est préparé selon le procédé de BULLEN et coll. ou la variante de BOVE et RAVEUX ; les éluants sont le chloroforme et le butanol.

L'échantillon est versé sur la colonne soit sous forme de solide lyophilisé (14) soit en solution aqueuse (28) ; dans les deux cas, il subit une préparation préalable pour purifier les acides et les concentrer. La purification comporte l'élimination des cations par passage de la solution à analyser sur une colonne cationique, puis élimination des sucres par passage sur colonne anionique qui laisse passer les sucres et retient les acides.

Ces derniers après élution sont mis sous forme libre par un nouveau passage sur colonne cationique (H^+).

La solution d'acide libre est enfin concentrée au bain-marie sous vide puis admise sur la colonne de gel de silice.

L'élution se fait avec un gradian de concentration croissante en Butanol dans le mélange éluant chlorofome-butanol. Dans les conditions décrites par G. JOLCHINE, les acides malique et citrique passent dans les fractions comprises entre 180 et 300 cc d'éluat. L'élution se fait à une vitesse de 2 à 3 cm^3 par minute ; on peut donc penser qu'on arriverait à une durée raisonnable de dosage.

Malgré tout, les séparations sur gel de silice sont longues étant donné les opérations préliminaires qu'elles nécessitent, de plus, la préparation des colonnes est assez délicate et les propriétés des gels de silice assez variables. Mais comme ces séparations sont très fines, on les emploie cependant chaque fois qu'il s'agit d'établir un bilan dans un milieu contenant beaucoup d'acides.

Cette méthode a d'ailleurs été appliquée au vin dans ce but, par DEMETRIOS ZAMPELAS (30).

Les acides sont dosés dans les fractions éluées par acidimétrie (29, 30). Ils pourraient l'être également par conductimétrie (JOLIVET (31) ou colorimétrie (22).

3° Chromatographie sur Célite.

A côté de la chromatographie sur gel de Silice, BUEDING YALE (32), WISEMAN et IRVIN (33) et EARLE SWIM et O'KRAMPITZ (34) ont utilisé comme support la poudre de diatomée ou « celite ». WISEMAN et IRVIN fractionnent par ce moyen les acides gras volatils en utilisant comme éluant un mélange de skellysolve et d'acetone ; un indicateur interne permet de contrôler la séparation.

Les éluants peuvent aussi être les mêmes qu'en chromatographie sur gel de Silice : chloroforme, Butanol.

B. — Méthodes utilisant les résines échangeuses d'ions.

1° Méthode Schenker et Rieman (35).

Ces deux auteurs utilisent de la Dowex I mise sous forme de nitrate, et comme éluant, des solutions de nitrate de Soude, d'acide borique et de tétraborate de Soude tamponnées à pH 6,15.

Le nitrate de Soude fournit les ions NO_3^- échangés et l'acide borique tamponne le milieu. Il doit également avoir pour effet de complexer les acides hydroxylés en donnant des complexes dont la dissociation et l'encombrement sont différents des produits de départ, ce qui a une grande influence sur la fixation des acides par la résine.

On utilise pour l'élution, deux éluants d'un volume total de 1 200 cc

passant à la vitesse de 3 cc par minute. La séparation est donc très longue. Dans cette méthode, les acides passent dans l'ordre suivant = acides malique, citrique, et tartrique.

Chacun des acides isolés est titré ensuite par oxydation manganique de la façon suivante :

— une prise aliquote des solutions d'acide est additionnée d'une quantité connue de permanganate et on laisse l'oxydation se poursuivre 60 minutes pour l'acide citrique, 105 minutes pour l'acide tartrique et 90 minutes pour l'acide malique au bain-marie à 30°. Dans ces conditions, les acides sont entièrement oxydés en CO_2 et H_2O. L'excès de permanganate est titré par l'oxalate et le permanganate en retour.

Cette méthode est donc très longue (8 h) et l'auteur indique une précision de $\pm$ 0,01 g/l.

Elle a été simplifiée par FENECH.

2° **Méthode Fenech** (36).

FENECH utilise une résine plus faible (Ionac 17) sous forme nitrate également avec un seul éluant (l'éluant A de SCHENKER et RIEMAN : NO_3Na 0,08 M). L'élution se fait à la vitesse de 2 cc/mn. L'acide malique passe entre 560 et 600 cc.

L'acidité est titrée par de la Soude N/10 en présence de Glycérol, l'indicateur étant la Phénol-phtaléine. On fait un essai à blanc à cause de l'acide borique.

SCHENKER et RIEMAN utilisent un échantillon de vin brut; FENECH lui fait subir une décoloration par le charbon animal. Ce traitement préalable a été par ailleurs critiqué par RODOPOULO (37) ; il entraîne des pertes et ce dernier auteur lui préfère un traitement préalable par des résines échangeuses d'ions.

Ces séparations paraissent délicates à reproduire. Pour notre part nous n'avons pas pu, par ce moyen, obtenir de bonnes séparations en respectant scrupuleusement le mode opératoire donné par ces auteurs en utilisant des résines ayant des coefficients de réticulation différents.

3° **Méthode Goodban et Stark** (22).

Ces auteurs utilisent l'Amberlite IRA 400 sous forme carbonate. L'éluant est le carbonate d'Ammonium. A l'inverse des deux méthodes précédentes, cette méthode n'a pas été mise au point pour le vin mais pour des extraits végétaux. Elle réclame donc pour le vin, une adaptation. La seule préparation de l'échantillon avant le fractionnement est son passage sur colonne de Dowex 50 destinée à retenir les cations. Pour

la séparation, les acides sont élués par du carbonate d'Ammonium 0,25 N. L'acide malique passe entre 50 et 90 cc d'éluat recueilli.

Le dosage de l'acide malique ainsi séparé est un dosage colorimétrique utilisant la couleur développée en chauffant l'acide malique en milieu sulfurique en présence de 2,7 naphtalène-diol (il y a formation alors d'acide aldéhydo-malonique qui se condense avec le réactif pour former l'hydroxy-naphtalène pyrone).

Au total, la méthode demande 2 heures, et l'acide est dosé avec une erreur de 2 p 100 environ. Ce serait certainement la plus simple et la plus courte des méthodes proposées, malheureusement, elle entraîne des erreurs pour plusieurs raisons.

La première est la libération par la résine de produits qui peuvent interférer lors de la réaction colorée.

La seconde, la principale cause d'erreur, réside dans ce que l'acide malique est mal séparé de l'acide tartrique, alors que l'acide tartrique interfère dans la réaction colorée.

L'auteur indique un terme correctif à utiliser lors du dosage de l'acide malique en présence d'acide tartrique mais ce terme ne corrige pas exactement l'erreur entraînée. C'est là un défaut grave pour les dosages dans le vin, qui renferme beaucoup d'acide tartrique.

4° **Méthode Harris Busch, Robert Hurlbert et Von Potter** (38).

La résine Dowex I, dans cette méthode, est mise sous forme formiate, l'éluant étant l'acide formique. Un dispositif mécanique réalise un gradian de concentration croissant pendant l'élution. Comme pour la précédente, c'est pour des extraits végétaux qu'elle a été mise au point et telle quelle, elle conviendrait davantage, comme la méthode au gel de silice, à l'établissement d'un bilan d'acides dans un milieu, qu'à un dosage de l'acide malique. Elle a d'ailleurs été utilisée à cette fin dans le cas des vins par J. Carles, Mlle Lamazou-Betbeder et Mme Renée Pech (39).

Cependant, elle est susceptible d'adaptation et nous lui donnerons pour le vin, la préférence. En effet :

— les acides fixes que l'on rencontre dans le vin et surtout l'acide malique sont bien séparés, à l'exception toutefois des acides tartrique et citrique qui se chevauchent un peu ;

— le dosage des fractions peut se faire facilement par la soude après évaporation de l'acide formique si l'on a affaire à des acides fixes ;

— enfin, le mode opératoire réclamerait une durée raisonnable pour un dosage (2 à 3 h).

C'est donc cette méthode, excellente pour l'établissement de bilans d'acides, que nous nous efforçons actuellement d'adapter au dosage de

l'acide malique — éventuellement aussi de l'acide lactique — et de simplifier suffisamment pour qu'elle puisse être utilisée au travail de série sans aucun appareillage coûteux ou compliqué par tous les laboratoires d'œnologie.

CONCLUSION

Dans cette mise au point bibliographique, qui n'a d'ailleurs pas la prétention d'être complète, nous avons passé en revue, d'une part les méthodes de dosage de l'acide malique actuellement les plus utilisées et d'autre part, les techniques de séparation de l'acide malique des autres acides organiques existant dans le vin.

Pour l'instant il n'existe pas encore de méthode de dosage chimique entièrement satisfaisante de l'acide malique pour le vin. Celles-ci étant trop longues ou trop peu précises ou les deux.

Cependant, l'emploi de la chromatographie sur colonne de silice ou de célite et surtout les échangeurs d'ions devraient permettre par une adaptation des méthodes existantes, de résoudre ce problème de façon satisfaisante.

Par ailleurs, il existe aussi un domaine que nous n'avons pas abordé ; c'est celui des dosages biologiques. Récemment une méthode de détermination de l'acide *l*-malique par décarboxylation enzymatique a été mise au point par Rosset et Dupuy (40). Elle ne nécessite aucun isolement préalable de l'acide, c'est un gros avantage ; mais, en raison de l'équipement nécessaire, elle n'est pas à la portée de tous les laboratoires.

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

(1) Girard et Lindet. — *Bull. Soc. Chimie*, p. 585, 1898.
(2) Dutoit et Duboux. — *Bull. Soc. Chimie*, p. 832, 1913.
(3) Laborde. — *C. R. Ac. Sc.*, **165**, 793, 1917.
(4) Mestrezat. — *C. R. Ac. Sc.*, **143**, 185, 1906.
(5) Von der Heide. — *Zeits An. Chem., 51*, 631, 1912.
(6) Bonifazi. — *Zeits An. Chem., 81*, 332.
(7) Gruhman et Gelbert. — *Z. lebensm. Unters. u. Forsh. C*, **3**, 1956.
(8) Ferre. — *An. Fals. Fraudes*, p. 82, 1938.
(9) Ventre (J.). — *An. des Fermentations*, **5**, p. 13 et 74, 1939.
(10) Jacquin, Tavernier. — *Ind. Agr. et Alim.*, p. 513, nov.-déc., 1949.
(11) Peynaud. — *Ann. Fals. Fraudes*, p. 332, *1938*.
(12) Jaulmes et Espezel. — *Ann. Fals. et Fraudes*, p. 325, 1935.
(13) Mathiez, Ramuz. — *Trav. de Chimie Alim. et Hyg. Lausanne*, **46**, 503, 1955.
(14) Roberts et Martin. — *Analytical Chemistry*, **26**, 815, 1954.
(15) Tanner et Rentschler. — *Obst. Weinbau*, **4**, 74 à 77, 1953.
(16) Hennig et Burkhardt. — *Z. lebensm. unters. u. Forsh.*, XCII, n° 4, 1951.

(17) H. DE ALMEIDA. — Dosage polarographique de l'ac. malique. *Institut vins de Porto*, édit. 1955.
(18) SEMICHON et FLANZY. — *C. R. Ac.Sc.*, 197. 198, 1933.
(19) BRUNEL. — *Traité pratique de Chimie Végétale*, t. IV.
(20) GRIGNARD. — *Traité de Chimie organique*, t. XI, fasc. I, p. 241.
(21) EEGRIWE. — *Z. An. Chem.*, **89**, 121, 1932.
(22) GOODBAN et STARK. — *Analytical Chemistry*, **29**, p. 283, 1957.
(23) NITSCHKE. — *Trav. Chim. Alim. et Hyg. Berne*, vol. **43**, fasc. I, 1952.
(24) CHEFTEL, MUNIER, MACHEBŒUF. — *Bull. Soc. Chim. Bio.*, **33**, 840, 1951.
(25) RIBEREAU-GAYON (P.). — *Ann, Fals. Fr.*, nº 541-542, p. 3, 1954.
(26) ISHERWOOD. — *Biochem. Journal*, **40**, 698, 1946.
(27) BULLEN, VARNER, BURREL. — *Analytical Chemistry*, **24**, 187, 1952.
(28) JOLCHINE (G.). — *Bull. Soc. Chim. Biol.*, **38**, 481, 1956.
(29) BOVE et RAVEUX. — *Bull. Soc. Chim. France*, nº 3, 369 à 381, 1957.
(30) DEMETRIOS ZAMPELAS. — *American J. of Enology*, **8**, 43, 1957.
(31) JOLIVET. — Thèse université d'Alger, 1957.
(32) BUEDING YALE. — *J. Biol. Chem.*, **193**, 411, 1951.
(33) WISEMAN et IRVIN. — *Agr. and Food Chem.*, p. 213, mars, 1957.
(34) EARLE SWIM et KRAMPITZ (O.). — *J. of Bacteriology*, **67**, 419, 1954.
(35) SHENKER et RIEMAN. — *Analytical Chemistry*, **25**, 815, 1953.
(36) FENECH. — Il Farmaco, *Fasc.* 7, 438, 1955.
(37) RODOPOULO. — *Vinodeli i Vinogradarstvo*, nº 5, 1956.
(38) BUSCH (H.), HURLBERT et POTTER. — *J. Biol. Chem.* **196**, 717, 1952.
(39) CARLES (J.), Mlle LAMAZOU-BETBEDER, Mme Renée PECH. — *C. R. Ac. Sc.*, **246**, 2 160, 1958.
(40) ROSSET (R.) et DUPUY (P.). — Ann. Technologie nº 4, 441, 1958.

ÉLABORATION DES VINS SPIRITUEUX DOUX

(Vins doux naturels)

RÉGLEMENTATION ET ALCOOLISATION

PAR

M. FLANZY

PLAN DU MÉMOIRE

I. — **Généralités.**
Vins spéciaux et vins « doux naturels ».
Définition.
Évolution de la Technologie des vins « doux naturels ».

II. — **Réglementation des vins « doux naturels ».**
Vinage, mutage, surmutage.
Évolution de la réglementation.
Appellation contrôlée.

III. — **Alcoolisation des vins « doux naturels ».**
Nature de l'alcool.
Quantité d'alcool exogène.
Moment de l'alcoolisation.
Surmutage.

IV. — **Conclusions.**

I. — Généralités.

Vins spéciaux et V. D. N.

La catégorie des vins spéciaux est extrêmement complexe. Elle englobe toutes les boissons vineuses qui ne répondent pas à la définition du vin (Flanzy, M. : Rapport National VIe Congrès International de la Vigne et du Vin, Athènes, 24 août-2 septembre 1950, B. O. I. V.). La définition donnée était la suivante :

« Sous le nom de vins spéciaux » on doit grouper tous les vins qui ne résultent pas exclusivement de la fermentation sans contrainte du Rai-

sin ou du Jus de Raisin frais et vierges de toute addition autre que les additions autorisées. Chaque fois qu'il y a contrainte (fermentation en récipient clos, bouteilles ou cuves pour l'élaboration du vin mousseux), chaque fois qu'il y aura addition ou d'alcool ou d'édulcorant, ou d'aromate ou d'acide carbonique, on élaborera un vin spécial.

Enfin, voici un autre caractère de finalité : les vins spéciaux ne sont pas consommés couramment. On en use généralement soit avant les repas comme apéritif, soit après les repas comme vin digestif ; ceux-ci sont appelés encore vins de dessert.

Sur le plan national la catégorie des vins spéciaux comprend les vins doux naturels, les vins de liqueur, les vins aromatisés, les vins mousseux.

Sur le plan international, elle est constituée par une gamme aussi variée de vins. En outre, une confusion dans la terminologie rend les textes correspondants difficilement compréhensibles d'un pays à l'autre.

C'est ainsi, par exemple, que sous le nom de vin de liqueur le Portugal et la France désignent deux types de vins différents. Quant au qualificatif vin doux naturel, il n'est employé qu'en France.

Il y a plus encore que cette confusion terminologique. Chaque pays a une réglementation bien différente pour des types de vins à peu près semblables.

Dans ces conditions, il est fort difficile de se comprendre d'un pays à l'autre. On l'a bien vu à l'occasion des travaux de l'Office International du Vin sur la « Définition des Vins Spéciaux » commencés à Athènes en 1950, poursuivis à Narbonne, Madrid, Lisbonne en 1951 et terminés en 1954 seulement à la 34e Session Plénière du Comité de l'O. I. V., les 20-23 septembre à Paris.

Ce souci d'unification manifesté par l'O. I. V. a abouti en 1954 à une définition précise de chaque type de vin spécial. Cette définition a eu avant tout comme critère les caractéristiques essentielles du vin.

Le Vin Doux Naturel, ainsi appelé dans la terminologie et législation françaises, est devenu dans la gamme définie par l'O. I. V. le Vin Spiritueux Doux. On marquait ainsi la double caractéristique de ce vin : fort degré alcoolique et douceur perceptible à la dégustation.

Définitions.

Il nous paraît indispensable de donner la définition française du Vin Doux Naturel et la définition par l'Office International du Vin, du Vin Spiritueux Doux.

La dénomination de « Vin Doux Naturel » est réservée aux vins provenant exclusivement de vendanges de Muscat, de Grenache, de Macabeu ou de Malvoisie ; toutefois sont admises les vendanges obtenues sur

des parcelles complantées dans la limite maximum de 10. p. 100 du nombre total de pieds avec des cépages autres que les quatre désignés ci-dessus.

En plus de la nature des cépages, la production ne doit pas excéder 40 hl de moût à l'ha et ce moût doit posséder une richesse alcoolique totale (alcool acquis et en puissance) d'au moins 14°.

Enfin, ces moûts doivent avoir reçu en cours de fermentation un apport, déterminé en alcool pur, de 5 p. 100 au minimum et de 10 p. 100 au maximum du volume des moûts, d'alcool titrant au moins 90°.

Finalement le V. D. N. doit titrer 21°5 (alcool acquis + alcool en puissance).

Ajoutons que la déclaration de fabrication doit indiquer le numéro du plan cadastral et la situation des parcelles dans lesquelles sont récoltées les vendanges.

Ce type de vin a été classé dans la catégorie « Vins Spiritueux Doux » qui a été définie ainsi à la 34e Session Officielle Plénière du Comité de l'I. O. V. les 20-23 septembre 1954 à Paris :

« Les vins spéciaux de cette catégorie sont issus du jus de raisin frais ou du raisin frais produit par des cépages appropriés de « Vitis Vinifera », additionnés seulement d'alcool de vin et contenant encore une quantité de sucre non fermenté supérieure à 5 g par litre ».

« Une partie du degré alcoolique acquis doit provenir de la fermentation partielle du sucre initial.

« La nature des cépages, la richesse minimum en sucre du jus initial et l'alcoolisation maximum devront être fixées par la législation de chaque pays ».

De tels vins sont caractérisés analytiquement par la présence simultanée d'une quantité d'alcool au moins égale à 15° G. L. et de sucre non fermenté, assez variable en quantité. L'infermentescibilité est réalisée par la grande masse d'alcool du milieu.

Leur élaboration est marquée par un apport endogène d'alcool sur le moût en fermentation. Ceci est fondamental.

Pour éviter toute confusion et faciliter la compréhension de cet exposé nous emploierons seulement le qualificatif Vin Doux Naturel. Mais il est bien entendu que, sur le plan international, il faudra traduire « Vin Spiritueux Doux ».

Evolution de la Technologie des V. D. N.

La définition de l'O. I. V. indique le double caractère de ces vins à la fois riches en alcool (Spiritueux) et en sucre (Doux).

Autrefois de tels vins s'élaboraient spontanément à partir de raisins convenablement riches en sucre. Ou bien ceux-ci, par des conditions privilégiées bien définies, l'étaient naturellement (passerillage), ou bien celui-

ci était obtenu artificiellement par torsion de la grappe, cueillette du raisin et exposition au soleil (pays méditerranéens) ou mise sur paille (pays septentrionaux).

Pendant cette surmaturation deux phénomènes opposés se produisent : d'une part, une concentration proprement dite touchant tous les constituants du raisin, d'autre part, une combustion physiologique qui a pour effet de réduire la proportion des acides, modifier leur répartition, « brûler » une certaine quantité de sucre, accroître considérablement la dose de pectine.

En bref, la composition du milieu est profondément modifiée.

Les moûts correspondants fermentent avec une extrême lenteur.

Certes, la haute proportion de sucres n'est pas étrangère à cette allure particulière de la fermentation. Mais on peut supposer que le milieu possède d'autres constituants provoquant une inhibition relative.

On oublie ces particularités quand, par exemple, on affirme que la vinification du « Muscat » doit proscrire les techniques où la fermentation elle-même élabore tout l'alcool constitutif.

On tend de plus en plus, afin de conserver la plus grande partie de l'arôme, à introduire la dose maximum d'alcool exogène dès le début de la fermentation alcoolique. Evidemment, les arômes sont plus facilement entraînés dans le cas de fermentation tumultueuse que dans celui des fermentations lentes. Mais dans le cas de raisins passerillés, vinifiés en fin de période automnale, à une époque où la température moyenne est plus basse qu'en pleine période de vendanges, les fermentations étaient fort lentes ; les pertes d'arôme étaient alors insignifiantes.

C'est pourquoi les vins « Muscat », vinifiés ainsi autrefois, avaient une haute réputation de qualité, et par leur arôme, et par leur judicieux équilibre sucre/alcool, où celui-ci était remarquablement fondu dans l'ensemble.

De tels procédés sont devenus de plus en plus délicats et de rentabilité insuffisante. Généralisant le vinage appliqué à l'élaboration des vins de consommation courante, on l'a étendu à l'élaboration des vins de liqueur, c'est-à-dire au traitement des moûts de raisin de richesse saccharique élevée, mais inférieure à celle des raisins passerillés. D'une façon plus précise, le vinage a été substitué au passerillage. Mais alors que dans le cas des vins ordinaires il s'agissait de relever le degré alcoolique des vins, il fallait ici conserver une dose suffisante de sucre. Les modalités d'emploi d'une quantité suffisante d'alcool permettaient de conserver non fermenté soit la totalité, soit une partie de la quantité de sucre équivalent à l'alcool ajouté. Le vin était ainsi à la fois spiritueux et doux, alors que sans cette affusion tout le sucre pouvait fermenter et le vin être finalement exclusivement spiritueux.

Ce changement a été fortement critiqué. C'est ainsi que M. CAZALES-ALUT écrivait :

« La pratique du vinage, appelé mutage dans le cas des Vins de Liqueur, a beaucoup nui à la réputation de certains crus qui produisaient les meilleurs Muscats. Ceci prouve que la méthode naturelle, c'est-à-dire celle qui consiste à laisser fermenter les moûts ou les raisins, sans addition d'aucun ingrédient, est la seule qui permette d'obtenir des vins d'aussi bonne qualité que ce que le comporte la nature du sol sur lequel ils ont été récoltés (CAZALES-ALUT, Messager Agricole, t. 1, p. 287, 1860).

Cette transformation fondamentale s'est faite avec des incidences fiscales. Il nous paraît nécessaire de les rappeler, si l'on veut comprendre les modalités de l'élaboration des Vins Doux Naturels.

II. — Réglementation des vins doux naturels.

Il est rare de trouver d'une façon aussi nette l'influence de considérations extra technologiques sur la technologie de ces boissons. On peut même dire que ces préoccupations fiscales ont marqué fondamentalement l'élaboration des vins spéciaux et particulièrement des Vins Doux Naturels.

La technique qui en résulte est critiquable aussi bien sur le plan technologique que sur le plan qualitatif et gustatif. On s'en rendra compte au cours de cet exposé.

Cette fiscalité impérative ne s'est pas établie d'un seul coup. Elle a subi périodiquement des fluctuations qui ont modifié, de période en période, les modalités d'élaboration de ce type de vins. Les textes correspondants sont rarement groupés. Et toute personne qui s'intéresse au problème des Vins Doux Naturels ne s'explique pas parfois la raison de telle technique de préférence à telle autre. C'est pourquoi il nous paraît que cette mise au point sur le V. D. N. doit suivre l'évolution dans le temps du régime fiscal qui leur est imposé.

Au cours de cet exposé certains peuvent s'interroger sur la signification de termes couramment utilisés tels que vinage, mutage, surmutage. Une définition de chacun d'eux nous paraît nécessaire.

Vinage. Mutage. Surmutage.

Il est intéressant de noter que le qualificatif vinage a pour racine *vin*. A l'origine, on désignait par cette expression le mélange de deux vins, l'un beaucoup moins alcoolique que l'autre, celui-ci ayant avant tout pour objet de relever le degré alcoolique des vins de trop faible degré. Il s'agissait, en fait, d'un coupage de vins essentiellement différents, où la richesse alcoolique était le facteur déterminant.

Ce vinage est pratiqué de nos jours, quand on mélange, par exemple, les vins de très faible degré alcoolique de certaines régions avec des vins corsés d'autres régions. Le vinage était bien un cas particulier du coupage des vins.

Mais, avec le temps, ce souci d'enrichissement alcoolique a trouvé plus commode de faire appel à l'eau-de-vie de vin, provenant de vins de plus faible degré, pour enrichir les autres vins. La tendance s'est peu à peu accentuée, jusqu'à faire appel à d'autres eaux-de-vie que les eaux-de-vie indigènes, à d'autres alcools que les alcools de vin.

On est ainsi arrivé à étendre le sens de vinage à l'enrichissement alcoolique des vins quels que soient les types, par des alcools de titre et d'origine divers. Aujourd'hui vinage est synonyme d'alcoolisation.

Actuellement on réserve le nom de vins vinés, à des vins qui constituent une matière première pour l'élaboration d'Eaux-de-Vie et la production de vins spéciaux (Vermouth, par exemple).

Quant à l'*alcoolisation des V. D. N.* on ne lui applique plus le qualificatif vinage, mais celui de *mutage*. Ce terme est impropre à plusieurs titres, car qui dit mutage dit prévention ou arrêt de la fermentation alcoolique. Or, par la définition même des Vins Doux Naturels cette affusion ne doit pas prévenir la fermentation alcoolique, car d'abord celle-ci doit avoir débuté et par ailleurs, mais en principe, elle ne doit pas être arrêtée.

Ensuite, le mutage peut être produit par d'autres éléments que l'alcool. En dehors de facteurs physiques tels que la température, des produits chimiques et biologiques (SO_2, antibiotiques, acide sorbique) peuvent être utilisés. Aussi dans le cas d'arrêt de la fermentation alcoolique doit-on préciser « mutage à l'alcool » par comparaison au mutage à SO_2. L'exemple de moût muté au SO_2 est le « jus sulfité », matière première pour l'élaboration des jus de raisin d'après la technique « sulfitation-désulfitation ». L'exemple de moût muté à l'alcool est la « mistelle » qui peut être consommée telle quelle ou servir de matière première à l'élaboration de vins spéciaux.

Toutefois, il est des cas où l'alcoolisation peut correspondre à un « mutage » à l'alcool ; cela se produit chaque fois que le moment de l'affusion et la quantité ajoutée, toujours dans les limites autorisées, sont tels que le milieu atteint instantanément une richesse alcoolique acquise à 15° au moins. Par exemple, si une affusion de 8 p. 100 est faite quand le moût en fermentation a déjà 8 à 9° d'alcool acquis.

Le *surmutage* est né de considérations pratiques et commerciales. On conçoit qu'au cours de la conservation des Vins Doux Naturels des pertes d'alcool aient lieu. Celles-ci sont inévitables quelles que soient les précautions prises. Enfin, la nature des matériaux des récipients et l'état hygrométrique du milieu peuvent agir dans un sens ou dans l'autre,

pour modifier l'équilibre $\frac{\text{Eau}}{\text{Alcool}}$ et $\frac{\text{Eau}}{\text{Sucre}}$ c'est-à-dire le degré alcoolique acquis et le degré alcoolique en puissance.

Si après la première phase d'élaboration la limite légale de 21°5 des Vins Doux Naturels (alcool acquis + alcool en puissance) est bien atteinte, celle-ci variera et pourra devenir inférieure à 21°5. Ce phénomène a eu des conséquences commerciales ennuyeuses. Les élaborateurs ont alors demandé et obtenu l'autorisation d'ajouter un complément d'alcool. C'est ce complément qui porte le nom de *surmutage*. Il est régi par une réglementation un peu différente de celle du « mutage » ainsi qu'on le verra plus loin.

Nous nous sommes efforcés de bien définir chacun des termes appliqués à l'alcoolisation des Vins Doux Naturels (vinage, mutage, surmutage). Il est évident que le qualificatif « alcoolisation » ne prête à aucune confusion. Il a même l'avantage de bien définir son objet — enrichir le milieu en alcool — et la source d'enrichissement, l'alcool. Par contre, les expressions vinage et mutage ne sont pas aussi explicites.

Dans ces conditions, le mot alcoolisation doit-il être substitué à ceux qui sont actuellement employés?

La question mérite d'être posée, car il est indispensable qu'à l'avenir, plus que par le passé, tout texte soit intelligible, non seulement pour les personnes idoines, mais encore pour toutes les autres; et tout spécialement pour les personnes des pays étrangers dont la législation peut être différente et la terminologie également. Il importe de plus en plus qu'aucune ambiguité ne subsiste. Une bonne terminologie diffuse mieux les connaissances, facilite les échanges et finalement accélère le progrès. Celle de la technologie des Vins Doux Naturels doit donc être examinée sous cet angle de compréhension aussi générale que possible et de progrès. Ce résultat sera d'autant mieux atteint que le qualificatif employé désignera bien l'objet de l'opération et si possible le produit employé.

Déjà on voit que le terme *vinage* offre une certaine ambiguité. Certes la tradition est assez vieille et si bien connue dans les divers pays qu'à la rigueur cette expression pourrait être retenue pour bien marquer un enrichissement alcoolique des vins en général, et des Vins Doux Naturels en particulier. Mais on pensera moins aux Vins Doux Naturels, consommables directement, qu'à des vins ordinaires, ainsi enrichis et susceptibles d'être ultérieurement distillés ou devenir vins de base pour la préparation de vins apéritifs, tels que les vermouths.

Par conséquent, on a intérêt à ne pas traduire, pour les Vins Doux Naturels, l'alcoolisation par le qualificatif « vinage ».

Nous ne reviendrons pas sur les observations déjà faites concernant l'expression mutage. Reconnaissons qu'il est indispensable de compléter l'expression par le complément « à l'alcool ». Dans ces conditions, on pré-

cise bien la nature de ce mutage. Mais ceci ne dit pas s'il y a réellement « mutage ». Ce terme conserve une réelle ambiguité même accompagné des mots « à l'alcool ».

Il est indiscutable que l'expression *alcoolisation* offrirait sur le plan international le grand avantage de clarté et de précision.

Nous l'appliquerons dans la partie technologique du mémoire. Mais pour l'historique de cette opération nous emploierons la terminologie inscrite dans les textes divers qui la règlementent.

Evolution de la réglementation.

Le « vinage » applicable aussi bien aux vins ordinaires qu'aux vins spéciaux a été soumis à une réglementation stricte avec des vicissitudes diverses.

Par les lois du 8 décembre 1814 (art. 21) et du 28 avril 1816 (art. 91) le vinage en franchise était autorisé partout dans la proportion de 5 p. 100 d'eau-de-vie par hl de vin. Aucune limite n'était assignée à la force alcoolique des vins soumis au vinage.

Cette restriction apparaît avec la loi du 24 juin 1824 qui n'admettait pas au vinage des vins titrant plus de 21°. Mais, avec cette loi, le vin pouvait être porté encore à 26°.

Ces vins, au titre alcoolique aussi élevé, furent la source de pratiques frauduleuses. Transportés dans les grands centres de consommation, ils y subissaient des dilutions aqueuses variables, pour offrir finalement au consommateur des vins de 10° environ qui n'étaient qu'un pâle reflet des vins naturels de même degré. Il fallait aviser.

Le décret-loi du 17 mars 1852 précisa que la faculté du vinage en franchise et sans limite était maintenue pour les vins destinés à l'exportation. Mais pour les vins destinés à la consommation intérieure, l'article 21 de ce décret-loi restreignait la faculté du vinage à sept départements méridionaux (Pyrénées-Orientales, Aude, Tarn, Hérault, Gard, Bouches-du-Rhône, Var).

En outre, et pour la première fois, une taxation fut établie. Au-delà d'une force alcoolique naturelle ou factice de 18°, tous les vins livrés à la consommation intérieure seraient passibles de surtaxes : de 18 à 21 degrés, il s'agissait du double droit de consommation sur l'alcool excédent 18°. Au-delà de 21° les vins étaient imposés comme alcool pur.

Ce privilège accordé aux départements méridionaux fut retiré par l'article 5 de la loi du 8 juin 1864.

La limite de 18° fut ramenée à 15° par la loi de finances du 13 septembre 1871. Mais, pour tenir compte des vins naturels dont la force alcoolique pouvait atteindre 18°, la loi de finances du 2 août 1872 (art. 3) précisa que ces vins naturellement riches seraient exempts de surtaxes dans les limites de 15 à 18°.

Jusqu'à présent, il n'est question que de « vinage » en général. Aucune distinction n'apparaît entre types de vins. Et pourtant quelle variété : vins ordinaires, vins spéciaux avec Vermouth, vins d'imitation, vins de liqueur ! Mais où sont les Vins Doux Naturels ? Ceux-ci sont encore confondus dans les Vins de Liqueur.

Pour la première fois la loi de finances du 13 avril 1898 introduit une distinction fondamentale entre Vins de Liqueur et Vins Doux Naturels. Cette loi est la *Charte des Vins Doux Naturels*. Jusqu'à la fin du XIXe siècle, tous les vins du même type, caractérisés à leur élaboration par une affusion d'alcool afin de conserver une certaine quantité de sucre, étaient appelés vins de Liqueur. Ceux-ci étaient soumis à des droits fiscaux élevés régis par les lois du 1er septembre 1871 et 2 août 1872. Or, certains de ces vins étaient élaborés à partir de cépages de haute qualité.

On a voulu, avec raison d'ailleurs, distinguer le vin obtenu à partir de ces cépages spéciaux des vins élaborés avec d'autres cépages dits ordinaires. Ce fut l'objet de la loi du 13 avril 1898, qui, pour éviter toute confusion, désigna cette catégorie noble par le qualificatif Vin Doux Naturel. Ceux-ci étaient en grande majorité élaborés dans les Pyrénées-Orientales et pour une partie du vin Muscat dans l'Hérault ; les Vins Doux Naturels bénéficiaient du régime ordinaire des vins, avec toutefois un droit réduit sur l'alcool ajouté (demi-droit de consommation) ; au contraire, le reste des Vins de Liqueur restait soumis à un régime fiscal très sévère, basé sur les taxes frappant l'alcool de consommation et cela sur la totalité de l'alcool.

L'article 21 de cette loi concerne encore les Vins de Liqueur. Elle est une nouvelle variante de la législation du « vinage ». « Par dérogation aux dispositions de l'article 3 de la loi du 13 septembre 1871, les Vermouths, ou Vins de Liqueur, ou d'imitation, sont imposés pour leur force alcoolique totale avec un minimum de perception de 16° pour les Vermouths et de 15° pour les Vins de Liqueurs. Il sont passibles des demi-droits de consommation, d'entrée et d'octroi jusqu'à 15°, et des droits pleins au-dessus de 15°... »

Et l'article 22 ajoute « Par exception au régime institué par l'article 21 pour les Vins de Liqueur en général, les Vins Doux Naturels, c'est-à-dire les vins possédant naturellement une richesse alcoolique totale acquise ou en puissance d'au moins 14° pourront, à la demande des producteurs et sur justification de leur nature, être maintenus sous le régime ordinaire des vins ».

Ce régime de faveur créé par l'article 22 de la loi du 13 avril 1898 n'était applicable qu'aux Vins Doux Naturels récoltés et préparés en France.

Les dispositions de l'article 22 ne s'appliquaient pas aux Vins Doux Naturels préparés en Corse et en Algérie (Circ. n° 304 du 31 août 1898).

A plus forte raison, devait-il en être de même des produits similaires provenant des pays étrangers (note autogr. du 14 mai 1900, n° 5985, Bull. Contr. Ind. 1900, n° 2.)

La loi de finances du 30 janvier 1907 devait réduire partiellement les avantages reconnus aux Vins Doux Naturels. En effet, par son article 12, elle précisait qu'à partir de 1909 l'alcool employé devait payer le droit entier de consommation jusqu'à 15° d'alcool acquis au lieu du demi droit payé jusqu'alors et le double droit de consommation pour l'alcool dépassant ce degré.

Il faudra attendre la loi de finances du 15 juillet 1921 (art. 15) pour élever la limite fiscale de 15° à 18°.

Jusqu'à présent nous n'avons pas mentionné un type de Vin Doux Naturel, vinifié sans affusion d'alcool et soumis en tous points au régime des Vins Doux Naturels. Il s'agissait de raisins des cépages exigés, de richesse sacchariique exceptionnelle qui, abandonnés à la fermentation alcoolique, arrivaient finalement à avoir une richesse alcoolique voisine de 15° et un reliquat de sucre suffisant pour leur donner la douceur recherchée. Ces vins, vraiment naturels, étaient admis au bénéfice du régime des Vins Doux Naturels sous les conditions suivantes :

Les viticulteurs qui obtiennent des Vins Doux Naturels sans addition d'alcool sont légalement tenus, au moment même de la récolte, de prévenir le service des Contributions Indirectes et justifier de leurs droits au régime exceptionnel sous lequel ils veulent placer leurs vins. La quantité et la nature de ces vins sont alors constatées par les employés, qui s'assurent que ces boissons remplissent bien la condition de richesse alcoolique minimum, acquise ou en puissance, exigée par la loi.

Si aucune contestation n'est soulevée, les expéditions sous le régime des vins peuvent être faites jusqu'à concurrence des quantités reconnues et mentionnées dans un acte régulier présenté à la signature de l'intéressé. Dans le cas contraire, des échantillons sont prélevés pour être soumis à l'examen des commissaires-experts institués par les lois des 27 juillet 1822 et 7 mai 1881. Il est ensuite procédé suivant les décisions des experts.

« Les vins dont il s'agit jouissent incontestablement des avantages de l'article 3 de la loi du 2 août 1872 si, par l'effet d'une seconde fermentation, ils viennent à titrer de 16 à 18° d'alcool au détriment de leur richesse saccharine » (lettre du Directeur des Pyrénées-Orientales du 16-12-1901). L'article 2 de la loi du 15-7-1921 leur est, du reste, aujourd'hui applicable.

On peut discuter sur le bien fondé du qualificatif « naturel ». Certains le trouvent excessif puisque la douceur est fonction d'un apport d'alcool, donc d'un artifice de fabrication.

(1) Manuel des C. I. — Édition 1925.

La circulaire des C. Ind. nº 330 du 13 avril 1898, prise en vue de l'application de cette loi fondamentale dit ceci :

« Ces vins, dans lesquels un commencement de fermentation à naturellement développé le bouquet en même temps qu'une certaine richesse alcoolique sont appelés « naturels » par opposition avec les moûts vinés quelconques ou mistelles n'ayant subi aucune fermentation et dont la richesse alcoolique totale est fournie par l'alcool ajouté.

Mais à partir de cépages autres que les cépages spéciaux, on produisait des vins tout à fait assimilables par leur technologie aux Vins Doux Naturels. Et ces vins, hors de la classe des Vins Doux Naturels, restaient Vins de Liqueur avec une partie d'alcool « naturel ». En fait la terminologie était justifiée en comparant les Vins Doux Naturels aux mistelles mais elle ne l'était pas si la comparaison se faisait entre Vins Doux Naturels et Vins de Liqueur.

La justification qu'essaie de donner N. Got (*Les Vins Doux Naturels*, 1947, Perpignan, p. 12) est-elle valable?

Cet auteur écrit :

« Certains ont contesté l'appellation Vins Doux Naturels. C'est à mon point de vue une dénomination légitime, car l'alcool ajouté ne peut dénaturer le produit. Au surplus, l'alcool utilisé ne tire-t-il pas son origine du vin »?

On verra plus loin que l'alcool peut ne pas être de l'alcool de vin. Son argumentation n'est donc pas rigoureuse.

Reconnaissons sans plus de commentaire que la terminologie de l'Office International du Vin, Vins Spiritueux Doux, est plus rationnelle que celle de la législation française.

Les lois, décrets et circulaires qui ont suivi ont précisé les modalités d'élaboration des Vins Doux Naturels non seulement sous les incidences fiscales et économiques mais également techniques et hygiéniques.

C'est ainsi que la loi de finances du 15 juillet 1914 (art. 34) énumère les cépages susceptibles d'être autorisés (Grenache, Macabeo, Muscat, Malvoisie). En cela elle précise les prescriptions de la loi du 13 avril 1898 qui parlait seulement de cépages spéciaux et légalise un état de fait.

Elle est plus tolérante puisque la circulaire d'application des C. I. nº 1023 du 25 juillet 1914 précise que « lorsque les vendanges servant à la préparation des Vins Doux Naturels ont été récoltées dans des vignes plantées de divers cépages, elles peuvent contenir, dans une proportion qui ne doit pas dépasser 25 p. 100 de leur poids ou de leur volume total, des raisins provenant de cépages autres que le Muscat, le Grenache, le Macabeo ou le Malvoisie ».

La loi de finances du 15 juillet 1921 est encore plus tolérante que les précédentes ; en effet elle élève la limite de 15°, fixée pour la percep-

tion des doubles droits de consommation, à 18°. Sur ce point on revient ainsi à la loi du 8 juin 1864,

Le décret du 19 août 1921 fixe les quantités d'alcool qui peuvent être utilisées. Il est remarquable qu'un minimum, 5. p. 100, et un maximum, 10 p. 100, soient imposés. Cela signifie qu'un Vin Doux Naturel doit recevoir obligatoirement au moins 5 p. 100 d'alcool du volume du moût à vinifier et au plus 10 p. 100. Mais que le vin en reçoive seulement 3 p. 100, il sera placé sous le régime des Vins de Liqueur avec la servitude d'une fiscalité beaucoup plus élevée.

Périodiquement on continue à faire le point des caractéristiques des Vins Doux Naturels en apportant des précisions sur les modalités de fabrication, la fiscalité. Il s'agit surtout de circulaires administratives.

Appellation contrôlée.

Mais voici un bouleversement profond dans le régime des Vins Doux Naturels. Le décret-loi du 13 juillet 1935 crée le régime des appellations contrôlées. Et, en application de ce décret-loi, un certain nombre de décrets pris en août 1936 accordaient le bénéfice de l'appellation contrôlée à une partie des Vins Doux Naturels, la plus importante il est vrai. Avant ce nouveau régime, tous les Vins Doux Naturels, quel que soit leur lieu de production, se trouvaient sous le même régime ; ils subissaient les mêmes obligations et bénéficiaient des mêmes avantages fiscaux.

A partir d'août 1936 il n'en est plus ainsi. Deux séries de Vins Doux Naturels sont créées.

En fait, en ses débuts, l'Appellation Contrôlée n'apportait qu'une garantie supplémentaire d'origine et une limitation de rendement. Toutes les autres conditions, aire de production, encépagement, degré minimum du moût, modalités du « vinage », étaient les mêmes pour les deux catégories de Vins Doux Naturels. On verra plus loin l'une des conséquences de cette création et, en particulier, les facilités de production qui furent accordées seulement au Vin Doux Naturel à appellation contrôlée.

En outre, le décret-loi du 13 juillet 1935 (art. 9) réduit la tolérance de 25 p. 100 à 10 p. 100 de l'encépagement autre que les quatre cépages classiques. Ceci est valable pour tous les Vins Doux Naturels.

Cette tolérance est rappelée par l'article 9 du décret-loi du 31 mai 1938. A ce sujet, il est important de remarquer qu'il ne s'agit plus de volume ou de poids de raisin, mais du nombre de ceps. Que les ceps tolérés soient plus prolifiques que les ceps imposés et cette proportion peut être sensiblement modifiée dans le sens d'une régression qualitative. En outre, ce texte précise que le volume de l'alcool doit être calculé par rapport au volume du moût à vinifier. Mais le décret du 29 juin 1938 rapporte ce volume au volume de vin à obtenir. Dans ces conditions, on exi-

geait une quantité plus grande d'alcool, exactement les 100/95e de la quantité auparavant utilisée pour la limite inférieure et 100/90e pour la limite supérieure.

Le régime des Vins Doux Naturels allait connaître des variations singulières à partir de 1941, sous la pression de considérations dites hygiéniques et sociales.

La loi de finances du 24 septembre 1941 distinguait réglementairement les Vins Doux Naturels à appellation contrôlée des Vins Doux Naturels sans appellation. Aussitôt après, la loi du 28 août 1942 restreignait le bénéfice du régime fiscal du vin aux seuls Vins Doux Naturels à appellation contrôlée.

Plus encore, sous le prétexte de pénurie d'alcool, l'attribution de l'alcool indispensable à l'élaboration des Vins Doux Naturels de la campagne 1942-1943 était faite seulement aux producteurs de Vins Doux Naturel à appellation contrôlée.

De graves injustices étaient ainsi commises avec de non moins graves répercussions aussi bien technologiques qu'économiques et, partant, sociales.

La loi de finances du 13 août 1947 (art. 5) devait mettre un point final à cette distinction discutable. Depuis, tous les Vins Doux Naturels bénéficient du régime fiscal des Vins Doux Naturels et des mêmes possibilités d'élaboration.

Mais il n'est pas interdit de penser que dans l'avenir des servitudes plus ou moins conséquentes soient infligées aux Vins Doux Naturels sans appellation.

Il est intéressant de noter ici quelques différences entre Vins Doux Naturels et Vins de Liqueur.

L'article premier du décret du 31 janvier 1930 définissant les Vins de Liqueur est significatif. Celui-ci ne fixe pas un minimum d'alcoolisation, alors qu'il est exigé pour les Vins Doux Naturels (5 p. 100).

Le Vin de Liqueur peut donc être moins alcoolique que le Vin Doux Naturel. La différence fondamentale est la nature des cépages autres que les quatre cépages imposés : Grenache, Muscat, Macabeo, Malvoisie. Paradoxalement un vin à base d'un cépage quelconque de Vitis Vinifera, vinifié exactement comme les Vins Doux Naturels, mais avec une affusion plus faible d'alcool, sera réputé, d'après la loi du 28 août 1942, plus « alcoolique » que le Vin Doux Naturel à degré alcoolique plus élevé.

Plus encore, par lettre des C. I. nº 3089 du 7 août 1941, on autorise pour les vins de liqueur une concentration partielle du moût au lieu et place de l'alcool correspondant alors qu'elle est interdite pour le Vin Doux Naturel.

Enfin avec les cépages classiques exigés pour l'élaboration des Vins Doux Naturels si, sans déclaration préalable de richesse exceptionnelle

du moût, on n'effectue dans l'élaboration du Vin Doux Naturel qu'une alcoolisation inférieure à 5 p. 100, le vin obtenu sera soumis au régime des Vins de liqueur.

Ainsi sous l'angle « alcoolisation » on peut actuellement faire la classification technologique suivante :

— Les Vins Doux Naturels qui exigent un « vinage » de 5 à 10 p. 100 avec un alcool titrant au moins 90°. Toute concentration est interdite.

— Les Vins de liqueur qui exigent un « vinage » sans fixation de minimum et avec toutes sortes d'alcool titrant au moins 46°. Une concentration partielle est tolérée.

— Les vins apéritifs n'exigent plus un « vinage » qui peut être remplacé, totalement ou partiellement, par la concentration du moût initial ou du vin.

A ce rappel de la réglementation fluctuante concernant les Vins Doux Naturels on a pu se rendre compte de l'incidence des considérations fiscales, économiques et hygiéniques, sur la technologie de ces boissons. Les ignorer, ce serait courir le risque d'élaborer involontairement des vins qui pourraient ne plus être soumis au régime des vins et les faire entrer dans la catégorie plus imposée des spiritueux.

On comprendra enfin mieux la définition des Vins « Doux Naturels » (France) identifiés actuellement aux Vins Spiritueux Doux et la justification de cette dernière terminologie de l'Office International du vin.

III. — L'alcoolisation des vins doux naturels.

L'alcoolisation étant une opération fondamentale, il nous paraît indispensable d'en examiner les différents aspects.

On doit distinguer successivement : la nature de l'alcool, sa proportion, la période de l'alcoolisation et l'instant précis de celle-ci.

Nature de l'alcool.

Jusqu'en 1933, les producteurs de Vin Doux Naturel avaient la possibilité de s'approvisionner en alcool, soit au marché libre, soit au Service des Alcools. Cette faculté de choisir leur est retirée par la loi de finances du 8 juillet 1933 (art. 2) qui précise :

« A compter du 1er août 1933, les vinages et mutages pour la consommation intérieure seront obligatoirement effectués avec des alcools retrocédés par l'Etat qui livrera à cet effet dans la limite de ses disponibilités des alcools de vin à concurrence des 3/4 des quantités nécessaires pour cet emploi (Manuel des Contributions Indirectes, p. 256).

Une exception est faite pour les vins mousseux dont les producteurs peuvent s'approvisionner au marché libre des eaux-de-vie (Circulaire des C. I. du 25-9-1933).

Contrairement à ce que pensent certains (N. Got « Les Vins Doux Naturels », 1947, p. 80) ce texte indique bien que le 1/4 de l'alcool utilisé peut avoir une origine autre que le vin. Comme il s'agit d'alcools rectifiés, non seulement ils peuvent être viniques (alcool de marcs), mais de tout autre plante que la vigne.

Les réglements en vigueur précisent que l'alcool doit titrer au moins 90°. En pratique l'alcool titre 95° et est de l'alcool neutre.

La dégustation permet une distinction nette. On trouve dans certaines circonstances le goût caractéristique des alcools de marcs, si bien rectifiés soient-ils. A ce sujet indiquons qu'à l'occasion d'essais de laboratoire, des vins présentaient nettement une odeur de benzine. L'alcool utilisé était déshydraté avec la benzine comme tiers corps pour la déshydratation.

Pour le surmutage on fait appel à de l'eau-de-vie ou des Trois-Six du marché libre. L'alcool de rétrocession est interdit.

Le problème de la nature de l'alcool n'est pas définitivement réglé. Alcool neutre, Trois-Six de vins, Eaux-de-Vie de vins, autant d'alcools qui, suivant les circonstances (nature du vin, moment de l'opération), peuvent être choisis, et l'un quelconque préféré à tous les autres. Une longue expérimentation est sur ce point encore nécessaire.

Quantité d'alcool exogène.

La quantité est réglementairement fixée à une proportion comprise entre 5 p. 100 et 10 p. 100 du vin à obtenir. Il s'agit d'alcool pur. C'est dire que pratiquement la proportion ajoutée est inversement proportionnelle au titre de l'alcool. Si celui-ci titre n degrés, ces proportions deviennent successivement :

$$\frac{5 \times 100}{n} \quad \text{et} \quad \frac{10 \times 100}{n}.$$

Ces proportions ne tiennent pas compte de la contraction du mélange alcool-moût.

On sait que l'eau et l'alcool se mélangent en toutes proportions mais en subissant une contraction de volume variable suivant la proportion du mélange. On a établi que cette contraction était maximum pour 54 g d'eau et 46 g d'alcool, c'est-à-dire pour 3 mol. d'eau et une molécule d'alcool.

A 15°C la contraction est de 3,784 pour 100 volumes du mélange résultant. Dans ces conditions, la simple règle de proportion pour calculer les proportions d'eau et d'alcool d'un degré à atteindre, ou calculer encore le degré que l'on obtient pour une quantité d'alcool déterminée, n'est pas exacte.

En outre, ce mélange produit un dégagement de chaleur qui modifie le volume des liquides mélangés et par conséquent complique le calcul.

Par ailleurs, les moûts ou les vins, par leur composition, ont un comportement différent de celui de l'eau. Certains de leurs constituants influencent l'allure de cette contraction.

Dans ces conditions le calcul ne peut donner qu'un résultat approximatif.

Enfin, dans la pratique de l'alcoolisation, des pertes d'alcool sont inévitables. Elles sont fonction de la température ambiante et du mélange, des modalités de l'opération, du degré de l'alcool employé. Elles sont toujours supérieures aux erreurs de calcul provoquées par la contraction, la variation de température, la composition du milieu.

En fait, malgré un calcul précis, les précautions les plus poussées, on n'obtient que très rarement le résultat calculé.

Moment de l'alcoolisation.

Ce moment est primordial. La législation impose qu'il soit effectué en cours de fermentation. Voici comment s'exprime la circulaire des C. I. n° 743 du 25 avril 1908.

« L'alcool destiné au vinage (1) des Vins Doux Naturels doit être employé avant achèvement de la fermentation de ces vins, ce qui implique évidemment l'idée que le mutage (2) doit avoir lieu au cours de la fermentation des produits (vendanges ou moût). On ne saurait donc admettre que l'alcool soit versé sur des vendanges fraîches n'ayant encore subi aucune fermentation ».

La restriction est toute relative car on peut opérer légalement depuis le début de la fermentation, quand le milieu a moins de 1° d'alcool acquis, jusqu'à la fin de la fermentation, quand le milieu a plus de 13° d'alcool acquis.

Ce moment de l'alcoolisation conditionne l'équilibre $\frac{\text{Sucre}}{\text{Alcool}}$.

Si l'affusion a lieu en fin de fermentation, on peut avoir une proportion trop élevée d'alcool, et le vin sera trop vineux. Au contraire, si cette addition a lieu tout au début de la fermentation, c'est une proportion trop élevée de sucre que l'on peut avoir. Le vin sera alors trop doux. Si ce caractère est non seulement acceptable, mais encore recherché pour les vins Muscats, (il est reconnu que le sucre exalte l'arôme muscat), il en est tout autrement pour les autres, Grenache, Macabeu, Malvoisie.

Par ailleurs, l'allure de la fermentation alcoolique est, dans la pratique, variable d'une année à l'autre. La température, surtout, joue un très grand rôle pour accélérer ou ralentir la fermentation alcoolique.

(1) et (2) Remarquer l'emploi simultané de vinage et mutage pour désigner la même opération.

L'élaborateur qui veut opérer à bon escient ne sait donc pas à l'avance à quel moment il devra opérer. Par ailleurs, cette alcoolisation doit être faite en présence des agents des Contributions Indirectes, auxquelles il doit indiquer à l'avance le jour et l'heure de l'opération. Ainsi l'élaboration fixe bien la période opérationnelle dans l'hypothèse où la récolte des raisins et la fermentation du Jus se dérouleront aux moments prévus. Dans la pratique, des contre-temps sont la règle. Aussi une large part d'incertitude préside à l'alcoolisation. Ou la fermentation alcoolique s'est ralentie ou elle s'est accélérée, soit par des causes banales, soit par un retard dans la présence des agents des Contributions Indirectes.

Dans le premier cas, l'affusion d'alcool est précoce : on enregistre alors les conséquences regrettables indiquées plus haut.

Dans le deuxième cas, le viticulteur s'efforce de ralentir et même d'arrêter la fermentation alcoolique. Pour cela il procède à une ou plusieurs additions d'anhydride sulfureux ou de métabisulfite de potassium. Le résultat final est analytiquement, pour certains vins, une dose de SO_2 élevée, parfois supérieure à 500 mg/litre, ce qui rend le vin impropre à la consommation.

Mais l'évolution ultérieure de SO_2 peut provoquer par oxydation (aération du vin) une production de SO_4H_2 qui s'ajoute à la dose endogène et donner finalement une dose de SO_4H_2 anormale. Par réduction (action réductrice de la levure en particulier) on obtient des traces de dérivés sulfhydrés qui impressionnent désagréablement l'odorat et le palais du dégustateur.

De toute façon l'artifice est déplorable aussi bien sur le plan analytique que sur le plan gustatif. Il est tout à fait contraire à une politique de qualité et plus encore à une vinification rationnelle.

Certes, par lettre du 8 septembre 1899 n° 10 642 (*Manuel des Contributions Indirectes* 1925, p. 458) le Service des Contributions Indirectes admettait à titre exceptionnel la dénaturation préalable de l'alcool et son utilisation à bon escient. « Comme le Service ne peut assister à toutes les opérations, l'Administration a admis, à titre exceptionnel, la dénaturation préalable de l'alcool par un premier versement de 20 à 25 p. 100 au maximum du moût à mettre en œuvre. »

On le voit, cette décision était motivée, non pas par un souci de qualité, mais simplement pour faciliter le travail des agents chargés de la surveillance de l'alcoolisation. Ceux-ci, en effet, auraient pu être demandés simultanément en plusieurs endroits.

En fait, quelques rares opérateurs utilisaient cette tolérance. Mais la très grande majorité des viticulteurs subissaient toute la rigueur de la règlementation administrative. Au point qu'en 1934 l'élaboration des Vins Doux Naturels présentait les problèmes suivants :

— *un problème réglementaire* sous la dépendance de l'Administration des Contributions Indirectes ;

— *un problème technologique* intéressant les modalités d'affusion de l'alcool et la nature de celui-ci.

Il était extrêmement important de résoudre le premier, non seulement pour améliorer la qualité des Vins Doux Naturels élaborés, mais aussi pour faciliter les solutions technologiques. La technologie de ces produits dépendait trop d'une réglementation plutôt préoccupée de fiscalité que de qualité, soucieuse, avant tout, d'éviter toute fraude sur l'alcool.

Dès les vendanges de 1934 une correspondance était échangée et des contacts établis entre la Station Régionale de Recherches Œnologiques de Narbonne (devenue depuis la Station Centrale de Technologie des Produits Végétaux) et les directions des Contributions Indirectes de l'Aude et des Pyrénées-Orientales.

En particulier, par lettre du 15 septembre 1934 nous posions nettement le problème de l'alcoolisation et les meilleures conditions de sa réalisation.

Cette correspondance, suivie de contacts utiles, aboutissait peu à peu à faire reconnaître les multiples avantages de l'alcoolisation laissée à la libre disposition du producteur grâce à une dénaturation préalable de l'alcool, celle-ci étant faite sous le contrôle de l'administration des Contributions Indirectes.

Aujourd'hui, on doit considérer ce problème comme pratiquement résolu. Chaque producteur déclare la quantité d'alcool qui lui est nécessaire, le reçoit, le dénature en présence des Contrôleurs des Contributions Indirectes. Il en a ensuite la libre disposition, en cours de vinification. Il est seulement tenu à justifier la balance de son compte alcool.

Mais le moment de l'alcoolisation n'est pas seul en cause. La période pendant laquelle elle est autorisée fait l'objet d'une réglementation précise. Un décret du 24-2-1949 (art. 1er) s'exprime ainsi :

« Les opérations de mutage doivent être effectuées avant le 31 décembre de l'année de récolte des moûts ».

Ce même décret marque bien à ce point de vue la différence entre le mutage et le surmutage sans que celui-ci soit nommément qualifié. Nous voici amenés à dire un mot du surmutage.

Surmutage.

Ce décret dit en effet : « Tous les compléments de mutage restent autorisés à toute époque de l'année tant sur les vins de la récolte que sur ceux des récoltes antérieures à la condition expresse que ces correctifs ne portent pas à plus de 10 p. 100 du volume des moûts traités, la quantité totale de l'alcool pur utilisée pour le mutage et les compléments de mutage » (A. F. F. t. 42, 213 ; 1949).

Ce décret permet, en particulier, grâce aux « complément du mutage » ou « surmutage » de tenir compte des pertes d'alcool au cours de la conser-

vation du vin. En définitive, un tel vin peut finalement avoir reçu une proportion d'alcool plus élevée que le maximum exigé. En quelque sorte, on fait une différence fondamentale entre la quantité ajoutée et la quantité finalement conservée.

Un autre décret du 24-2-1949 (art. 1er), légalise d'une façon plus précise ce complément de mutage, défini pour la première fois surmutage.

« Des surmutages à l'aide de l'eau-de-vie de vin peuvent être opérés par les élaborateurs sur les lots de Vin Doux Naturel dont le degré minimum réglementaire de 21°5 (alcool acquis et en puissance) a été obtenu par l'emploi d'une quantité d'alcool titrant au moins 90° et ne dépassant pas 8,5 p. 100 de ce même volume des moûts. L'addition d'eau-de-vie de vin ne doit pas porter à plus de 10 p. 100 du dit volume la quantité totale d'alcool pur utilisée pour le mutage et le surmutage (A. F. F., t, 42, 213, 1949).

Ce « surmutage » se trouve confirmé, sans modification, par le décret du 7 octobre 1954 (art. 1er). Toutefois, il précise 21°5 d'alcool total dont 15° d'alcool acquis (A. F. F., t. 47, 465, 1954).

Citons encore le décret du 23 octobre 1957 concernant les Vins Doux Naturels à appellation contrôlée. Il rappelle les décrets des 13 avril 1951, 24 février 1949 et 7 octobre 1954 concernant le blocage, le mutage et le surmutage des Vins Doux Naturels. En outre, il donne les indications suivantes :

— Toute opération d'enrichissement autre que le mutage et le surmutage dans les conditions réglementées et spécialement toute opération de chaptalisation, concentration, ou congelation, même dans les limites légales, est interdite sous peine de faire perdre le droit à l'appellation contrôlée sur lequel elle aurait été pratiquée.

— Les vendanges des jeunes vignes ne pourront servir à l'élaboration du Vin Doux Naturel contrôlé qu'à partir de la 4e feuille du greffon (celle-ci comprise) après greffage sur place et après mise en place de racinés greffés (A. F. F., 50, 445, 1957).

L'article 2 introduit une limitation de production au-delà de laquelle le Vin Doux Naturel est déclassé mais reste Vin Doux Naturel. Toutefois, des dérogations sont autorisées. En pratique, on peut considérer que la limitation de rendement est encore une des caractéristiques de la réglementation des Vins Doux Naturels.

Ce qui doit surtout être retenu de ce décret c'est l'interdiction de toute technique d'enrichissement autre que celle d'alcoolisation.

Il est indiscutable que, sur le plan qualitatif et hygiénique, le sucrage, par exemple, pourrait apparaître plus bénéfique que l'alcoolisation. L'expérimentation correspondante doit pouvoir être faite. S'y opposer, pour des questions de réglementation, à allure fiscale, serait aller à l'encontre du progrès, et partant, de la raison d'être de notre activité.

IV. — CONCLUSION.

On a essayé de dire l'essentiel sur la réglementation des Vins Doux Naturels. Certes, quelques omissions peuvent encore apparaître ; elles pourront être facilement réparées.

On remarquera que le plus souvent les textes qui régissent cette production sont des lois de finances, des décrets ou circulaires des Services des Finances et rarement des documents ressortissant exclusivement de la Production Agricole. L'alcool et sa réglementation exercent leur emprise.

Or, le problème de l'alcoolisation est loin d'être épuisé. Qualité de l'alcool, modalités d'affusion, autant de facteurs qui devraient évoluer en fonction du cru, des préférences du consommateur ; tout cela en dehors évidemment, des modifications législatives.

Mais l'alcoolisation n'est qu'un aspect du problème général de l'enrichissement des moûts. C'est ce problème qui mérite d'être traité dans toutes ses possibilités.

On s'aperçoit alors, sur le plan expérimental, que le dilemne suivant est posé : Ou la réglementation existante est considérée comme impérative et fixée dans ses grandes lignes ; dans ces conditions, il est vain de rechercher une amélioration profonde du problème de la technologie des Vins Doux Naturels. Ou bien on passe outre à cette réglementation pour réaliser une expérimentation rationnelle ; c'est naturellement ce dernier point de vue qui doit être adopté, avec l'espoir, qu'en la circonstance, la réglementation future sera fonction du progrès technologique. En un mot, ce n'est plus le régime de l'alcool qui doit « marquer » la technologie des Vins Doux Naturels, mais, au contraire, l'amélioration qualitative et nutritionnelle des Vins Doux Naturels.

Ce serait méconnaître l'importance des autres facteurs de production des Vins Doux Naturels que de s'arrêter exclusivement sur celui de l'enrichissement des moûts, en général, de l'alcoolisation, en particulier. Aire de production, encépagement, maturité des raisins, modalités de leur cueillette et de mise en train, autant de sujets qui n'ont pas à s'inquiéter de servitudes fiscales et, par conséquent, où la recherche peut se donner libre cours.

La production des Vins Doux Naturels n'est qu'une faible partie de la production viticole française. Elle en est un des beaux fleurons au même titre que les Champagnes et les grands crus des autres provinces françaises.

Elle est la production unique de certaines régions, la seule possible. A ce titre, toute étude susceptible d'améliorer la production des Vins Doux Naturels est une contribution au progrès économique et social.

NOTE SUR LA MÉTHODE DE L'ÉCHELLE HÉDONIQUE POUR MESURER LES PRÉFÉRENCES GUSTATIVES

PAR

M. RIVES

Station de Recherches viticoles et d'Arboriculture fruitière, Pont-de-la-Maye.

Ce qui suit est inspiré d'un article encarté dans Food Technology, *volume 11, numéro de septembre 1957, en même temps qu'un certain nombre d'autres qui constituent le compte-rendu d'un colloque sur les essais de dégustation. Les auteurs en sont D. R. Peryam et F. J. Pilgrim, de l'Intendance américaine.*

Il y a en gros 2 catégories de méthodes pour faire des essais de dégustation.

La plus ancienne et la plus couramment employée, parce qu'elle est la plus facile à organiser et la plus intuitive, consiste à faire goûter un certain nombre d'échantillons par un certain nombre de gens, et à leur demander de donner des notes chiffrées suivant une échelle déterminée au départ. Elle peut être assortie soit de conseils pour l'analyse des sensations, soit de repères constitués par des échantillons témoins dont la note est fixée à l'avance, soit enfin d'une éducation préalable ou d'une sélection des membres du jury ainsi constitué.

Les échantillons sont ensuite classés d'après la moyenne des notes obtenues auprès des différents dégustateurs.

Une seconde méthode qui est beaucoup moins intuitive, mais qui a l'avantage d'une plus grande rigueur mathématique, est celle qui consiste à donner à déguster des échantillons par 2 et à faire indiquer par les membres du jury leur préférence pour un des échantillons du couple. Elle se complète obligatoirement par un dispositif en blocs incomplets qui permet d'interpréter les résultats de manière statistiquement valable.

L'inconvénient de cette dernière méthode est que, à mesure que le nombre d'échantillons à déguster augmente, le nombre de comparaisons de paires qu'il faut demander aux dégustateurs croit énormément. D'autre part, les dégustateurs ne voient pas immédiatement le résultat de leur jugement et il leur est très difficile de se rendre compte des conséquences d'ensemble de leurs notations.

On se heurte ici à la difficulté psychologique majeure de ce genre d'essais. D'une part on a avantage à ce que le dégustateur ait le moins possible d'informations préalables sur ce qu'il déguste et sur les conséquences d'ensemble de son jugement, afin de ne pas l'influencer. D'autre part, la structure des jurys que l'on est la plupart du temps obligé de constituer impose souvent des pré-

cautions diplomatiques à l'égard des jurés dont on ne peut que difficilement discuter la compétence.

En effet, deux cas peuvent se présenter en ce qui concerne les jurés : ou ce sont des experts compétents capables d'analyser leurs sensations en fonction d'un système préétabli et reconnu, ou on a pris des personnes non qualifiées et de bonne volonté. Dans le second cas on a sans doute une meilleure estimation du « goût moyen » ; dans le premier, si les jurés sont vraiment compétents, on peut avoir un meilleur jugement dans des cas spéciaux.

Un troisième cas est celui où on trie les jurés en fonction d'une aptitude particulière, par exemple à déceler un mauvais goût précis ; on complète alors souvent la sélection par une éducation destinée à affiner le don des dégustateurs ; ce cas est trop spécial pour nous intéresser ici.

Quand on prend des personnes de bonne volonté et non préparées on peut espérer que les grands nombres remédieront aux difficultés inhérentes à l'emploi d'une échelle de notation *chiffrée*.

Les principales difficultés auxquelles on se heurte dans ce cas sont :

— les différences de moyennes entre les jugements des individus, certains notant systématiquement haut, certains bas,

— les différences de variance, certains individus ayant tendance à ne noter que dans une zone réduite de l'échelle,

— et surtout l'influence des discussions entre jurés ou des connaissances préalables sur les échantillons.

La méthode de l'échelle hédonique est une adaptation de celle de l'échelle chiffrée qui remédie à ces inconvénients en utilisant des dispositifs suggérés par une étude psychologique de la question. Elle s'applique à des individus isolés dans de petites loges individuelles. On leur passe l'échantillon à travers un guichet et ils goûtent et notent absolument seuls et sans témoins.

Un texte dont la traduction est donnée plus loin les prépare à donner le plus rapidement possible leur première impression, c'est-à-dire à ne pas tenir compte des considérations autres que leur préférence personnelle et immédiate.

D'autre part, elle présente le gros intérêt d'éliminer un facteur psychologique de distorsion des résultats, qui est l'emploi d'une échelle chiffrée. Celle-ci modifie totalement l'attitude du dégustateur par rapport à la tâche qu'on lui a demandée. Il n'est plus un individu indiquant sa préférence personnelle, mais un magister donnant des notes dans un examen.

D'autre part, la nécessité pour une personne non préparée, de convertir ses sensations en chiffres en ne disposant d'aucun point de repère pour le faire, augmente encore la difficulté de l'opération.

La principale caractéristique de l'échelle hédonique est qu'elle remplace une échelle de 1 à 9, par exemple, par une échelle exactement semblable mais où les chiffres ont été remplacés par les locutions suivantes :

— l'échantillon x :

me plaît énormément,
me plaît beaucoup,
me plaît assez,
me plaît un peu,
ne me plaît ni ne me déplaît,
me déplaît un peu,
me déplaît assez,
me déplaît beaucoup,
me déplaît énormément.

Ces locutions sont rangées dans cet ordre sur des formules préparées à l'avance et qui comportent en en-tête les références habituelles : nom du dégustateur, date, etc.

Elles sont rangées en colonnes ou en lignes correspondant chacune à un produit dégusté.

Tout est fait pour suggérer une progression continue d'un bout à l'autre de l'échelle et on voit l'avantage que constitue, par rapport à la notation chiffrée, l'emploi de locutions accessibles à tous et qui font partie du vocabulaire habituel des individus non entraînés quand ils donnent leur avis sur un produit quelconque.

Le texte proposé par les auteurs et qui est affiché dans chaque loge de dégustation, de manière à être lu et compris aussi facilement que possible par tous (il s'agit ici d'un aménagement psychologique de la méthode de l'échelle de notation et aucun moyen psychologique ne doit être négligé pour arriver au but qu'on se propose, c'est-à-dire d'avoir une bonne image du goût moyen du consommateur) est le suivant (traduction aussi fidèle que possible) :

« Vous allez recevoir un certain nombre de plats à manger et on vous demande de dire sur chacun à quel point il vous plaît ou vous déplaît.

« Utilisez les échelles pour indiquer votre point de vue en cochant à l'endroit qui correspond le mieux à ce que vous pensez du plat.

« Rappelez-vous que vous êtes le juge. Vous êtes la seule personne qui puisse dire ce que vous aimez. Personne ne sait si ce plat doit être considéré comme bon, mauvais ou indifférent.

« Une indication sincère de ce que vous en pensez personnellement nous aidera à décider.

« Prenez un verre d'eau après chaque échantillon et attendez le suivant ».

Tant au sujet de ce texte que de celui des locutions qui constituent les échelles, il faut observer, d'une part que l'original en anglais est destiné à un public américain qui présente la particularité d'être plus entraîné que le public européen à ce genre d'exercices et en même temps plus accessible à de telles méthodes, d'autre part que la traduction qui est ici donnée déforme forcément le sens et la portée de la langue originale.

On voit donc qu'il y aurait, pour bien faire, deux sortes d'opérations à réaliser sur ces textes : d'une part une bonne traduction de l'anglais en français et d'autre part une réadaptation à l'usage du public français et par des méthodes psychométriques appliquées à ce public, des termes employés.

En ce qui concerne les échelles cependant, le couple des verbes « plaire » et « déplaire » me semble être le seul qui puisse répondre à la nécessité de traduire le couple anglais *like* et *dislike* employé dans l'original.

Il est extrêmement important en effet d'utiliser tout le long de l'échelle des locutions aussi uniformes que possible afin de renforcer l'impression de continuité.

Pour l'interprétation statistique des réponses, il suffit de remplacer chaque point de l'échelle, exprimé par une locution, par une note chiffrée de 1 à 9 ou de — 4 à + 4 et d'utiliser l'analyse de la variance classique qui peut fort bien, comme le suggèrent les auteurs, être complètée par le test de DUNCAN (1955).

D'après les auteurs, on arrive à une précision telle qu'une diflérence d'un demi-point soit significative quand on utilise trente à quarante individus.

Toutes les ressources de la statistique en matière de dispositifs peuvent être utilisés (essais factoriels, etc.).

Effets spéciaux.

Un certain nombre d'effets spéciaux sont cependant à prévoir :

Le premier est l'effet de contraste qui fait qu'un échantillon moyen est noté moins bien s'il vient immédiatement après un échantillon très bon, que s'il vient après un échantillon très mauvais.

Le second est l'inverse du premier. C'est l'effet de contamination qui fait que, dans une série de qualité générale médiocre, par exemple, un échantillon moyen est noté plus mal que dans une série de qualité meilleure.

Le troisième effet est l'effet de position. Il consiste en ce que la position d'un échantillon dans la série des échantillons dégustés influe sur le jugement moyen qu'il reçoit. En règle générale, le premier échantillon a toujours une note meilleure et les suivants des notes décroissantes en moyenne, quel que soit le produit et quelle que soit la qualité propre ; cela vient probablement d'un phénomène de fatigue.

Cet effet varie considérablement avec la nature des aliments présentés. Il serait particulièrement marqué avec le café, où le second échantillon est considérablement déprécié par rapport au premier, la décroissance étant ensuite lente, alors que pour d'autres aliments, la fatigue n'apparaît qu'après trois ou quatre échantillons et se traduit par une dépréciation moins grande. Le public américain, semble-t-il, ne se fatigue jamais du lait frais ou du jus d'orange, pour lesquels l'effet de position serait totalement absent. Il est à craindre qu'il n'y ait là une différence notable avec le public français.

Valeur de la méthode.

Des essais ont été réalisés pour comparer la méthode de l'échelle hédonique avec le comportement réel des consommateurs. Dans l'un de ceux-ci on a mesuré les préférences réelles du consommateur en prenant note des produits les plus souvent consommés par un groupe de cent soldats américains dont on a observé ce qu'ils prenaient pour leur repas dans une cantine self-service, où l'on avait pris soin que la présentation suggère le moins possible de préférence pour l'un ou l'autre des produits. Le coefficient de corrélation avec la méthode de l'échelle hédonique, appliquée au même groupe sous forme d'un questionnaire concernant l'ensemble des produits, a été de 0,74, tant en ce qui concerne la fréquence que la quantité des produits consommés.

En l'absence de critères de dégustation permettant à un jury de dégustateurs entraînés, et après vérification de leur capacité de jugement, de noter les qualités d'un produit d'une manière objective, l'échelle hédonique semble donc fournir une meilleure mesure du goût moyen d'un groupe de dégustateurs non préparés que la classique notation chiffrée. Puisqu'on reste dans le domaine de la psychologie, l'essai d'une méthode nouvelle, assortie du pittoresque attaché à son exotisme relatif, doit pouvoir permettre de la faire accepter même dans des milieux où l'habitude de dégustations avec notations chiffrées étant déjà implantée, on pourrait avoir des difficultés à introduire des modifications

qui consistent en fait à diminuer l'importance de l'individu dans l'essai en le considérant comme un être un peu irresponsable, puisqu'on lui demande une impression et non pas un jugement.

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

PERYAM (D. R.) et PILGRIM (H. J.). — Hedonic scale method of measuring food preferences dans : Themethodology of sensory testing ; encart dans *Food technol.* Sept. 1957,

DUNCAN (D. B.). — Multiple range and multiple F tests. Biometrics 11 : 1-42 : 1955 (revue en préparation dans les *Annales de l'Amélioration des Plantes.*)

NOTE SUR LA VALEUR DE L'HUILE DE PÉPINS DE RAISIN EN ACIDES GRAS ESSENTIELS

PAR

FLANZY (J.) et FLANZY (M.)

Station de Biochimie et de Nutrition, Jouy-en-Josas.

Station Centrale de Technologie des Produits végétaux, Narbonne.

On connaît mieux à présent les besoins de l'homme en acides gras essentiels (1). En conséquence tout corps gras riche en ces acides prend à présent une importance nutritionnelle et éventuellement thérapeutique importante.

Or, quelques travaux ont indiqué la richesse de l'huile de pépin de raisin en acide linoléique ; mais les techniques employées peuvent laisser subsister quelque doute.

L'objet de nos recherches en la matière a donc été d'abord de rechercher et éventuellement de confirmer ce caractère fondamental ; ensuite d'établir l'influence du mode d'élaboration sur la présence éventuelle des acides gras essentiels ; enfin de compléter les documents analytiques par une étude spectrographique des huiles en lumière U. V.

Les 4 échantillons étudiés proviennent d'un même lot de 500 tonnes de pépins secs. Ils représentent donc une production courante et non pas une extraction en laboratoire à des fins analytiques seulement. Les 4 échantillons se décomposent ainsi :

1. — huile de pression ;
2. — huille d'extraction ;
3. — huile filtrée non démargarinée ;
4. — huile filtrée démargarinée.

Voici la filiation de ces 4 échantillons :

L'huile de pression est obtenue par pression à chaud des pépins écrasés. On extrait 50 p. 100 de l'huile contenue dans les pépins. Le tourteau restant est traité par l'essence qui extrait ainsi la majeure partie de l'huile restante. C'est *l'huile d'extraction*. Le mélange d'huile de pression et d'huile d'extraction est filtré sur terre adsorbante. C'est l'*huile filtrée non démargarinée*. Celle-ci démargarinée puis désodorisée et décolorée est *l'huile démargarinée*.

Les deux dernières huiles sont donc des huiles plus ou moins raffinées. La dernière l'étant le plus.

Ces échantillons contenaient de l'eau et des matières solides en suspension. Pour les purifier on a successivement :

repris chaque échantillon par 4 fois son volume de $CH\,Cl_3$;

séché ces solutions chloroformiques par SO_4NA_2 anhydre ;

filtré et distillé ensuite ;

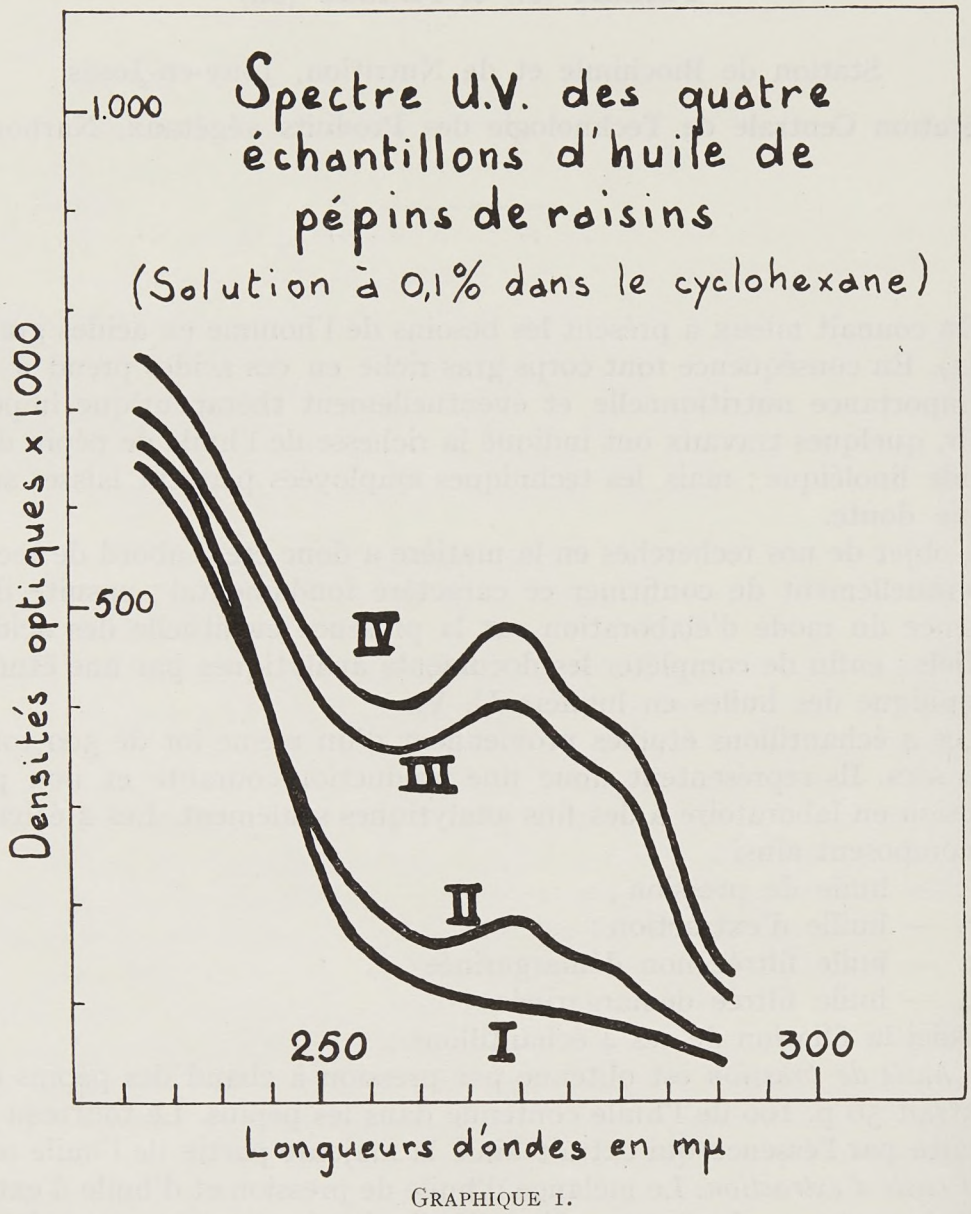
chassé les dernières traces de $CH\,Cl_3$ sous vide et en faisant barbotter un léger courant de N.

Sur les huiles ainsi préparées on a procédé à l'analyse chimique et aux déterminations spectrographiques.

ANALYSE CHIMIQUE ET SPECTROGRAPHIQUE

L'indice d'iode a été déterminé par la méthode KAUFMANN en traitant l'excès de Br par $S_2O_3Na_2$ N/10 (2).

Les acides saturés ont été appréciés par la méthode BERTRAM (3).



GRAPHIQUE 1.

On a calculé l'acide oléique en fonction de l'indice d'iode des acides totaux et de la teneur de ceux-ci en acides polyinsaturés. La différence p. 100 nous a donné les acides saturés.

Nous avons toutefois vérifié dans un cas l'accord entre le calcul et le dosage direct des acides saturés par la méthode BERTRAM.

Les acides polyinsaturés sont dosés par la méthode spectrophotométrique après isomérisation par une solution de potasse glycolique 1,3 N pendant 25 minutes en application de la méthode MITCHELL-KRAYBILL. On a adopté pour l'acide linoléique :

$$E^{1\ cm}_{1\ \%} \text{ à } 233\ m\mu = 921\ (4).$$

Les résultats sont inscrits dans le tableau I.

TABLEAU

Composition en acides gras
(% en poids)

N° de l'échantillon		I	II	III	IV
Indice d'iode des acides		141,9	138,4	136,2	137,2
Acides	Linoléique	71,4	65,0	62,7	61,6
	Oléique	13,8	22,8	25,0	28,2
	Saturés	14,8	12,2	12,3	10,2

Spectre U. V. avant isomérisation. La densité optique de la solution à 0,1 p. 100 d'huile dans le cyclohexane optiquement plat est mesurée de 230 à 300 mμ (5). Les résultats sont inscrits dans le graphique 1.

DISCUSSION DES RÉSULTATS

Les données chimiques.

Tout d'abord il faut noter la richesse de ces échantillons en acide linoléique, supérieure à 60 p. 100. A titre indicatif voici la composition de quelques huiles reconnues comme les plus riches en acide linoléique (5) :

Huile de tournesol	50-66 p. 100
Huile de soja	40-55 p. 100
Huile de maïs	34-48 p. 100
Huile de noix	66-74 p. 100.

Notons encore l'abaissement de la teneur en acide linoléique entre l'huile de pression (échantillon n° 1) et l'huile la plus complètement traitée (échantillon n° 4).

Le mode d'extraction établit une première différence. L'huile de pression est plus riche que l'huile d'extraction par solvant.

Examiné sous cet angle tout traitement serait préjudiciable à la valeur de l'huile, source d'A. G. E.

Malgré cette réduction, l'huile de pépin de raisin se situe au niveau l'huile de noix, la plus riche en acide linoléique et au-dessus de l'huile de tournesol recommandée comme source de cet acide gras essentiel.

On doit noter ensuite l'absence d'acide linolénique et d'acides polyinsaturés supérieurs.

Le Spectre d'Absorption.

Il faut noter la différence entre les échantillons 1 et 2 d'une part ; 3 et 4 d'autre part. Ceux-ci ont un pic caractéristique dans la bande 270 mm. Les échantillons 1 et 2 ne l'ont pas. Notons toutefois le léger décrochage entre la courbe 1 et la courbe 2.

Si nous nous rapportons aux travaux de J. P. WOLFF (5) on doit mettre cette caractéristique des échantillons 3 et 4 sur le compte des traitements subis par les huiles correspondantes et 'admettre que les corps qui absorbent à 270 mμ se forment au détriment de l'un des corps absorbant à 232 mμ. La filiation serait la suivante : formation d'hydropéroxydes de l'acide linoléique et passage des peroxydes à des triènes conjugués.

De toute façon cette absorption à 270 mμ caractériserait bien une oxydation qui serait évitée dans le cas des huiles 1 et 2.

Par les travaux de SILVESTRE en particulier, on sait que l'huile de pépin de raisin est très riche en tocophérols, qu'à ce titre, elle se classe quantitativement au niveau de l'huile de germe de blé (6). Mais alors que celle-ci est surtout riche en forme α, c'est surtout en autres formes, donc dans les formes les plus antioxygènes que l'huile de pépin est riche.

On peut donc supposer, ou bien que les traitements réduisent la dose de tocophérols antioxygène et facilitent ainsi indirectement les phénomènes d'oxydation ou bien que sans modifier sensiblement la dose de ceux-ci les terres absorbantes constituent directement elles-mêmes des facteurs d'oxydation, ou bien que les deux phénomènes ont lieu simultanément (ce qui est le plus vraisemblable).

CONCLUSION

L'huile de pépins de raisins déjà riche en tocophérols, est très riche en acide linoléique. Elle doit être, à ce titre, classée en tête des huiles végétales. C'est donc une huile intéressante sur le plan biochimique, nutritionnel et peut-être thérapeutique.

Malheureusement, les traitements atténuent, très légèrement il est vrai, cette valeur nutritionnelle. Par ailleurs, la technologie de production de l'huile de pépins de raisins est loin d'être satisfaisante (séparation et conservation des pépins en particulier). La valeur reconnue de l'huile de pépin commande une étude systématique d'une part du pépin de raisin, d'autre part de l'huile extraite, à la fois sur le plan biochimique et physiologique.

Si le problème de la conservation des pépins est avantageusement résolu, quelle pourrait être la répercussion de cette production sur l'économie viticole?

On peut admettre que la production viticole française réservée à la production du vin est normalement de 100 millions de quintaux de raisins. Ces 100 millions donnent environ 20 millions de quintaux de marc. En moyenne on admet que les marcs donnent 20 p. 100 de pépins, les pépins 10 p. 100 d'huile.

On peut penser que, bien organisée, l'industrie correspondante pourrait traiter environ le marc de 50 millions de quintaux de raisin. Dans ces conditions, il est facile de calculer que la production d'huile pourrait être de 15.000 tonnes environ, étant bien entendu que cette huile aurait toutes les qualités requises pour la rendre apte à la consommation humaine et à l'usage thérapeutique. Au

prix moyen de 400 francs le kilogramme, il en résulterait une plus value de 6 milliards, non négligeable sur le plan économique.

Ces considérations économiques et les particularités de l'huile de pépins de raisin sur le plan nutritionnel montrent l'intérêt du problème des pépins de raisin et d'une façon plus générale, de celui des dérivés de la vigne et du vin.

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

(1) PAQUOT (C.). — Le rôle des corps gras dans l'alimentation humaine. *Oléagineux*, **14**, 1-7, 1959.
(2) KAUFMANN (H. P.). — Fette U. Seifen, **47**, 4, 1940.
(3) BERTRAM (S. H.). — *Unters-Lebensm.*, **55**, 179, 1928.
(4) PITT (G. A. J.) et MORTON (R. A.). — Progress in the Chemistry of fats and other lipids. Pergamon Press, vol. 4, 227, 1957.
(5) WOLFF (J. P.). — Application de la Spectrophotométrie U. V. à l'examen de la qualité des corps gras alimentaires. *Ann. Fals. fr.*, **50**, 149-166, 1957.
WOLFF (J. P.). — *Rev. Franç. des corps gras*, **1**, 214, 1954.
WOLFF (G.) et WOLFF (J. P.). — Méthodes d'analyse et de contrôle industriel des matières grasses. Dunod, Paris, 1953.
(6) SILVESTRE (J.). — Contribution à l'étude des Tocophérols du pépin de raisin. Thèse de Pharmacie. Toulouse 1953.
(7) BLAIZOT (J.). — La vitamine E.Ali m. et vie (*Bull. Soc. Sc. Hyg. Alim.*), **38**, 237-249, 1950.

CHRONIQUE DES LIVRES

ANALYSE ET CONTRÔLE DES VINS [1]

PAR

J. RIBÉREAU-GAYON et E. PEYNAUD

DEUXIÈME ÉDITION - 1958

J. Ribéreau-Gayon et E. Peynaud viennent de publier une nouvelle édition de leur traité de 1947 ; « Analyse et Contrôle des Vins ».

Bien présentée, agréable à consulter, elle se présente maintenant sous la forme d'un gros ouvrage in-8 de 550 p. contenant 88 figures.

Les auteurs paraissent s'être assignés un triple but : *a*) mettre à la disposition des analystes les méthodes qu'ils emploient eux-mêmes avec succès ; *b*) donner les notions de chimie générale qui permettent de mieux comprendre et d'interpréter les résultats ; *c*) indiquer les méthodes utilisées pour la recherche des fraudes et l'état actuel de la législation.

Après 21 chapitres bien complets, elle comporte un important appendice dont les documents analytiques ont été renouvelés et les documents législatifs mis à jour.

Nous ne signalons, dans cette présentation, que les nouveautés et les modifications apportées à la 1re Édition.

Le chapitre I est consacré aux méthodes modernes d'analyse appliquées au vin. On y trouve des notions de spectrophotométrie (spectrophotométrie par absorption, son principe, l'appareillage, gamme-témoin, colorimètre type Duboscq, appareils à cellules photoélectriques, diffusoabsorptiomètre type Dognon), un aperçu sur les méthodes chromatographiques (chromatographie sur colonne, envisageant trois mécanismes qui peuvent intervenir au cours du fractionnement : adsorption vraie, échange d'ions, partage entre deux solvants ; chromatographie sur papier) ; un bref exposé sur la photométrie de flammes, la polarographie, la complexométrie, les méthodes de dosage microbiologique.

Les chapitres II (Dégustation), III (Alcool éthylique) n'apportent que des nouveautés de détail.

[1] Librairie Polytechnique Ch. Béranger, Paris.

Le chapitre IV (Densité et extrait sec) décrit le procédé mixte, utilisé par TAVERNIER-JACQUIN pour la détermination de l'extrait sec des moûts de pomme et des cidres, appliqué au vin par JAULMES et Mlle HAMELLE.

Au chapitre V (Acidité de titration ou acidité totale) un paragraphe est consacré à l'effet tampon si important dans les vins.

Le chapitre VI (Acidité Volatile) reproduit fidèlement le chapitre correspondant de la première édition, avec toutefois en note finale le dosage de l'acide formique suivant Mlle LAFON.

Le chapitre VII (consacré aux Acides organiques) comporte une étude de l'évaluation de l'acide malique par chromatographie sur papier, suivant P. RIBÉREAU-GAYON, un dosage de l'acide succinique suivant PEYNAUD et LAFON avec titrage potentiométrique, pour l'acide gluconique la description de la méthode PEYNAUD-CHARPENTIÉ, basée sur la production de formol par oxydation periodique.

Le chapitre VIII (Concentration en ions H) décrit le montage et le fonctionnement du pH-mètre QUÉRÉ. Cette limitation est justifiée par les auteurs.

Le chapitre IX, consacré aux matières minérales, apporte certaines nouveautés : technique GEORGEAKOPOULOS de dosage de l'ion chlorhydrique, adoptée par la Convention Internationale, qui procède à une défécation barytique puis une décoloration permanganique ; technique FLANZY-DEIBNER de dosage simultané de SO_2 et de l'anion sulfurique, également adoptée par la Convention Internationale ; méthode FREY de dosage de l'ion phosphorique par précipitation du phosphomolybdate d'ammonium ; pour le potassium, méthode au tétraphénylborate et méthode photométrique ; en ce qui concerne le fer, méthode DEIBNER-BOUZIGUES à l'orthophénantroline, méthode au ferron (mode opératoire de ROUBERT), une méthode volumétrique par complexométrie, pour le cuivre la méthode au 2-2 diquinolyle, pour le plomb la méthode BONASTRE, très voisine de celle décrite par JAULMES, pour le manganèse un dosage polarographique. Le chapitre se termine par l'exposé d'une méthode de dosage polarographique simultané de Pb, Zn, Cu.

Le chapitre X (réservé aux Glucides, Polysaccharides et Pectines) présente dans la nouvelle édition une méthode de dosage des pentoses et pentosanes, un bref aperçu de chromatographie sur papier appliquée aux sucres, la méthode PEYNAUD de dosage des pectines, une appréciation de la teneur en sucres par réfractométrie, une méthode colorimétrique de recherche du saccharose.

Le chapitre XI (Polyalcools), apporte le dosage du glycérol par évaluation colorimétrique de l'aldéhyde formé avec l'acide chromotropique, une méthode microbiologique de dosage de l'inositol.

Au chapitre XII (Composants volatils et odorants des vins) les auteurs proposent la méthode TAVERNIER-JACQUIN de dosage du méthanol (oxydation du méthanol en formol par Mn O4K en milieu phosphorique et dosage colorimétrique à l'aide du réactif de Schiff).

Au chapitre XIII (Substances azotées) une étude sur la caractérisation et l'estimation des acides aminés par chromatographie sur papier, le dosage de l'azote protéidique, celui de l'azote assimilable par les levures suivant TARANTOLA.

Le chapitre XIV (Acide sulfureux) comporte le titrage potentiométrique, la méthode des électrodes polarisées de TANNER et RENTSCHLER, et la méthode DEIBNER de dosage de l'acide sulfureux total.

Le chapitre XV est consacré aux composés phénoliques. La chimie

œnologique est, en ce domaine, en pleine évolution. On sait, par ailleurs, l'importance de ces substances à l'égard des caractères organoleptiques du vin et de ses transformations. Le dosage de ces composés phénoliques est extrêmement complexe ; les résultats obtenus dépendent du tanin choisi comme type, et de la propriété sur laquelle est basée la méthode de dosage utilisée.

Les auteurs donnent une technique (P. RIBÉREAU-GAYON) de différenciation des vins par la nature de leurs anthocyannes, par chromatographie sur papier.

Le chapitre XVI (Potentiel d'oxydo-réduction) est plus développé que dans l'édition précédente. Les auteurs y signalent la pipette-électrode démontable de MARECA-CORTÉS (qui a également servi à celui-ci pour le dosage potentiométrique de SO_2 par l'iode et le dosage de l'alcool par la méthode chimique) et l'étude du vin par titrage potentiométrique.

Les chapitres XVII (Troubles et dépôts), XVIII (Vins spéciaux et vins altérés), XIX (Recherche du mouillage), sont les mêmes que dans la première édition.

Le chapitre XX (Falsifications diverses), décrit la méthode ARATA de recherche des matières colorantes acides dérivées de la houille, la méthode MICKO de recherche des substances aromatiques dans les vins et spiritueux, la méthode allemande d'examen des vins vinés, les méthodes MAUREL par spectrographie U. V. et chromatographique de CORDONNIER permettant de déceler l'aromatisation artificielle des V. D. N. et des vins de liqueur.

Signalons toutefois que les méthodes MICKO et allemande n'étaient pas, à l'origine, destinées à déceler les fraudes possibles, mais sont utilisées couramment pour l'estimation de la valeur des vins vinés destinés, en particulier, à l'exportation.

Le dernier chapitre est consacré aux antiseptiques et édulcorants. Les auteurs y décrivent une méthode biologique de recherche des antiseptiques. Cet essai est délicat puisqu'il faut déceler une faible quantité d'antiseptique étranger à côté de substances inhibitrices naturelles pouvant elles-mêmes intervenir pour une grande part et masquer l'effet du produit cherché. Ils décrivent le mode opératoire conseillé par eux.

Ils donnent ensuite une technique de caractérisation des composés fluorés suivant GARINO-CANINA, et une méthode exacte de dosage de ces composés dérivée de celle de WILLARD et WINTER, qui consiste à transformer le fluor en acide hydrofluosilicique et à hydrolyser ce dernier en acide fluorhydrique. Le fluor est finalement titré par une solution de nitrate de thorium en présence d'alizarine sulfonate de Na ; l'acide borique est dosé par la méthode TAVERNIER-JACQUIN qui séparent le bore des cendres du vin, par distillation en présence de méthanol, à l'état d'ester triméthylique. Après saponification, on dose colorimétriquement à l'aide de la réaction spécifique à la quinalizarine ; l'acide benzoïque et ses dérivés sont caractérisés par sublimation, d'après SERIS ; les esters de l'acide p.oxybenzoïque sont titrés par bromométrie, d'après le mode opératoire de GUILLAUME et MEHL.

Un appendice termine ce volume. La première partie est consacrée aux procédés officiels d'analyse des vins, la seconde partie aux documents législatifs, circulaires et textes divers, la troisième partie à des documents analytiques ; les tables usuelles sont reproduites dans la quatrième partie.

Ce livre pourra être utilisé au laboratoire comme un recueil de techniques analytiques. Beaucoup d'entre elles ont été mises au point par les auteurs ou leurs proches collaborateurs. Elles sont décrites avec une grande précision,

qui doit permettre à des manipulateurs ayant une culture chimique limitée, de pratiquer ces dosages avec succès. Les calculs analytiques seront bien facilités par l'emploi de nombreuses tables données à la fin de l'ouvrage.

Dans plusieurs chapitres de larges exposés de chimie générale sont faits sur des points particulièrement importants, par exemple sur l'acidité de titration, le pH, le potentiel d'oxydo-réduction. La rédaction de ces pages est simple et claire et les explications permettront en bien des cas d'éviter de consulter des ouvrages spécialisés. C'est là un deuxième aspect de ce traité, qui lui donne une réelle valeur pour la formation des étudiants.

C'est cet aspect intéressant qui nous amène à faire quelques observations.

Les auteurs ont bien précisé qu'ils décrivent seulement, parmi toutes les méthodes d'analyse, celles qui leur ont paru les meilleures. Leur choix semble parfois discutable. L'essentiel toutefois est de décrire une méthode valable, ce qui est très généralement le cas.

Mais, pourquoi les auteurs n'ont-ils pas présenté plus objectivement la Convention de 1954 à laquelle ils ont si activement participé ? Ils connaissent bien les conditions de son élaboration, le choix qu'il a fallu faire. En un mot, ils savent qu'on ne pouvait faire autre chose que ce qui a été fait.

Ces rares critiques démontrent en fait qu'une œuvre est rarement parfaite malgré la science et le travail de leurs auteurs, travail d'équipe pourtant — où chacun a apporté tout son savoir. On mesure ainsi l'extrême difficulté d'une tâche particulièrement ardue mais bien résolue.

Les œnologues seront amenés à confronter cette nouvelle édition de l'ouvrage de J. Ribéreau-Gayon et E. Peynaud et le traité de Jaulmes (Analyse des vins 1954). Ils pourront ainsi mesurer les progrès de l'Analyse en œnologie réalisés entre les deux dates et reconnaître que cet ensemble honore la science œnologique française et la science tout court.

Possédant maintenant un bel outil analytique ils attendent avec quelque impatience le traité d'Œnologie, que les auteurs bordelais ont en préparation.

Le Directeur Gérant : B. Laclavière.

Imprimerie Bussière à Saint-Amand (Cher), France. — 14-5-1959
Dépôt légal : 2e trimestre 1959 *N° d'impression : 395*

MISE EN ÉVIDENCE DANS CERTAINS FROMAGES DE SYSTÈMES ENZYMATIQUES ACTIFS SUR LA TYROSINE

PAR

P. RAIBAUD, RUTH HERREN ET G. MOCQUOT

Station centrale de Recherches laitières,
et de Technologie des produits animaux, Jouy-en-Josas.

et

F. V. KOSIKOWSKI (1)

Department of Dairy Industry, Cornell University, Ithaca, N. Y., U. S. A.

La diversité et la complexité des processus qui se déroulent au cours de la maturation des fromages ont depuis longtemps retenu l'attention des biochimistes. Les moyens d'investigation dans ce genre de recherche sont variés : dosage périodique d'acides aminés à différents stades de la maturation (1, 2, 3, 4, 5), utilisation de la chromatographie sur papier pour identifier les nombreux métabolites formés (6, 7, 8, 9, 10, 11, 12), recherche des systèmes enzymatiques qui interviennent dans la formation de ces métabolites (13, 14, 15, 16).

Cette dernière méthode présente un intérêt tout particulier : en effet, durant la maturation des fromages, on assiste à l'apparition de nombreux produits de dégradation alors que le nombre de bactéries vivantes ne cesse de diminuer. Ce fait met en lumière le rôle prépondérant dévolu aux enzymes microbiens qui poursuivent leur activité propre en l'absence de toute prolifération des cellules bactériennes.

Parmi les produits de dégradation que l'on peut rencontrer dans les fromages au cours de leur maturation, la tyramine tient une place importante comme l'ont montré KOSIKOWSKI et DAHLBERG (17). Mais d'autres produits phénoliques peuvent être également présents ; ainsi SIMONART et MAYAUDON (18) ont montré que les acides p.hydroxyphénylacétique et phénylacétique se rencontraient dans de nombreux types de fromages : Gruyère, Gouda, Roquefort, Camembert et Limbourg.

(1) Boursier Fulbright en France (1955).

Aussi avons-nous cherché à mettre en évidence, dans des fromages de type varié, la présence d'enzymes capables de dégrader la tyrosine en tyramine ou capables de former d'autres composés phénoliques à partir de la tyrosine ou de la tyramine.

MODE OPÉRATOIRE ET MÉTHODES DE DOSAGES

1. — Principe de la méthode.

La méthode que nous avons choisie pour mettre en évidence la présence dans les fromages de systèmes enzymatiques actifs sur la tyrosine est la suivante : l'échantillon de fromage est mis en suspension dans une solution de tyrosine tamponnée à pH 5,5, puis il est incubé à 34°C : on se place ainsi dans les conditions optimales de pH et de température déterminées par GALE (19) et BELLAMY et GUNSALUS (19) pour l'activité des décarboxylases bactériennes (18) et en particulier des décarboxylases de *Streptococcus faecalis* (19). Si ces enzymes sont présents dans l'échantillon de fromage étudié, leur activité se manifeste par la formation de tyramine à partir de la tyrosine et le dosage de la tyramine formée au bout d'un temps d'incubation donné donne une mesure de l'activité potentielle de ces systèmes enzymatiques. Si d'autres enzymes agissent sur la tyrosine ou la tyramine dans les conditions de pH et de température choisies, leur présence sera révélée par le dosage de composés phénoliques autres que la tyramine dans la suspension de fromage.

2. — Préparation des suspensions de fromage et des échantillons pour le dosage des composés phénoliques.

100 g de fromage sont broyés dans un Turmix avec un tampon à pH 5,50 (1) contenant 0,4 p. 1 000 de L(-)tyrosine (substrat-tyrosine). La suspension de fromage, amenée à 1 000 ml avec ce substrat-tyrosine, est répartie en 5 flacons, à raison de 200 ml par flacon, auxquels on ajoute 5 ml de chloroforme R. P. pour inhiber le développement des bactéries sans inhiber leurs enzymes. L'un des flacons, qui servira de témoin, est additionné de 20 ml d'acide trichloracétique à 50 p. 100 : l'activité des systèmes enzymatiques est ainsi bloquée. Les autres flacons sont incubés 2, 4, 7 et 10 jours à 34°C. Après ces divers temps d'incubation, on ajoute, comme pour le flacon témoin, 20 ml d'acide trichloracétique à 50 p. 100. Tous les filtrats trichloracétiques sont amenés à 250 ml avec de l'eau distillée. D'autres filtrats trichloracétiques sont préparés, selon la même technique, à partir du lait cru auquel on ajoute des quantités connues de tyramine ; ils serviront à établir la courbe étalon pour le dosage de la tyrosine.

(1) Substrat-tyrosine :
L(-)tyrosine : 0,4 g ; acide acétique R. P. : 1,125 ml ; acétate de sodium anhydre : 20,39 g ; eau distillée : qs 1 000 ml.

3. — Dosage des composés phénoliques dans les filtrats trichloracétiques.

Quatre groupes de composés phénoliques ont été dosés :

a) Les composés phénoliques basiques.

Dans le cas des fromages, il s'agit de la tyramine, comme l'ont montré KOSIKOWSKI et DAHLBERG (17). Le filtrat est d'abord soumis à une extraction par l'éther sulfurique anhydre à pH 1,2 (pH du filtrat), puis à une extraction à pH 10. par le même solvant. La tyramine est dosée dans le résidu de cette deuxième extraction par colorimétrie selon la méthode de SILVERMAN et KOSIKOWSKI (20) qui utilise la réaction de Millon.

b) Les composés phénoliques neutres et basiques.

Le filtrat est soumis à une extraction alcaline sans extraction acide préalable. Le résidu de cette extraction contient la tyramine et les composés phénoliques extractibles à la fois en milieu acide et en milieu alcalin que nous appellerons neutres, selon la terminologie de SCHORMÜLLER (2).

Extractions et dosages sont effectués comme précédemment.

c) Les composés phénoliques acides et neutres.

Le filtrat est soumis à une extraction acide seulement. Le résidu de cette extraction contient les composés phénoliques neutres et ceux qui ne sont extractibles qu'en milieu acide, que nous appellerons acides. Les extractions et le dosage sont conduits comme précédemment mais dans ce cas l'acide trichloracétique extrait par l'éther provoque, au moment où l'on ajoute le sulfate mercurique, un des constituants du réactif de Millon, la formation d'un précipité qui doit être éliminé par filtration. D'autre part la coloration obtenue est instable ; la lecture doit être faite 1 minute après l'addition du nitrite.

d) Les composés phénoliques insolubles dans l'éther : tyrosine.

Le filtrat est soumis à une extraction acide puis alcaline et la tyrosine est dosée dans la phase aqueuse comme la tyramine.

4. — Contrôle bactériologique.

Avant l'addition de l'acide trichloracétique on prélève 1 ml de la suspension et l'on effectue une numération sur gélose nutritive standard (1) pour contrôler le développement microbien éventuel au cours de l'incubation.

(1) Extrait de levure (Yeastrel) : 3 g ; extrait de viande (Lab lemco) : 5 g ; peptone (Evans) : 3 g ; glucose : 10 g ; eau distillée : qs pour 1 000 ml ; pH final = 7,3.

RÉSULTATS

1. — Établissement de la courbe étalon pour le dosage de la tyramine.

La courbe étalon (fig. 1) que nous avons utilisée pour doser la tyramine dans les filtrats trichloracétiques de fromage est établie à partir des filtrats de lait cru contenant des quantités connues de tyramine et soumis à une extraction alcaline sans extraction acide préalable.

On voit sur la figure 1 que les valeurs expérimentales diffèrent de

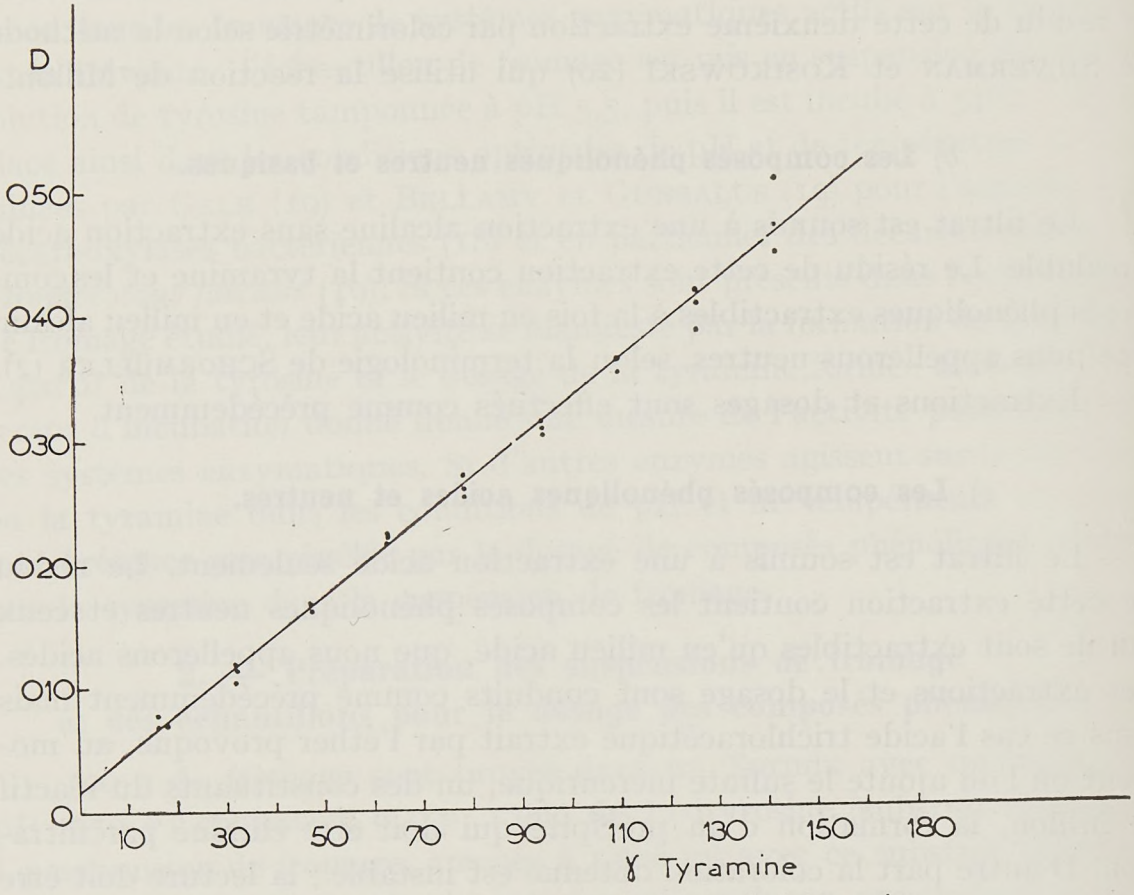


FIG. 1. — Courbe étalon pour le dosage de la tyramine dans le filtrat trichloracétique d'une suspension de fromage.

la valeur calculée sur la courbe étalon de 5 p. 100 ou moins entre 40 γ et 120 γ de tyramine. Les valeurs extrêmes sont moins bien groupées : l'écart atteint 15 p. 100 pour les valeurs inférieures à 40 γ et 10 p. 100 pour les valeurs supérieures à 120 γ.

2. — Extraction de la tyramine en milieu acide.

La figure 2 montre qu'une fraction de la tyramine, malgré ses propriétés basiques, peut être extraite, en milieu acide, du filtrat trichloracétique, lorsque la concentration en tyramine dépasse 400 γ par g de fromage. Il faut en tenir compte pour évaluer la teneur en composés phénoliques acides et neutres des résidus de l'extraction acide.

3. — Variations de la teneur en composés phénoliques de divers types de fromages en fonction de la durée d'incubation.

Les résultats concernant chaque échantillon de fromage sont rassemblés dans un graphique qui comporte 4 courbes. La courbe 1 représente les variations des teneurs en composés phénoliques neutres et en tyramine. La courbe 2 représente les variations de la teneur en tyramine. Pour ces deux courbes les résultats sont exprimés en γ de tyramine par g de fromage. La courbe 3 représente les variations de la teneur en composés phénoliques acides et neutres. Les résultats sont exprimés en densité optique D, que l'on calcule ainsi : le dosage dans le résidu de l'extraction acide donne une densité optique globale D_A. Connaissant la teneur en tyramine de l'échantillon considéré, on calcule, sur le graphique 2, la densité optique D_T qui correspond à la tyramine extraite en milieu acide. La valeur de D est :

$$D = D_A - D_T.$$

Enfin la courbe 4 représente les variations du nombre de bactéries vivantes au cours de l'incubation, exprimé en $\log_{10}$ par g de fromage.

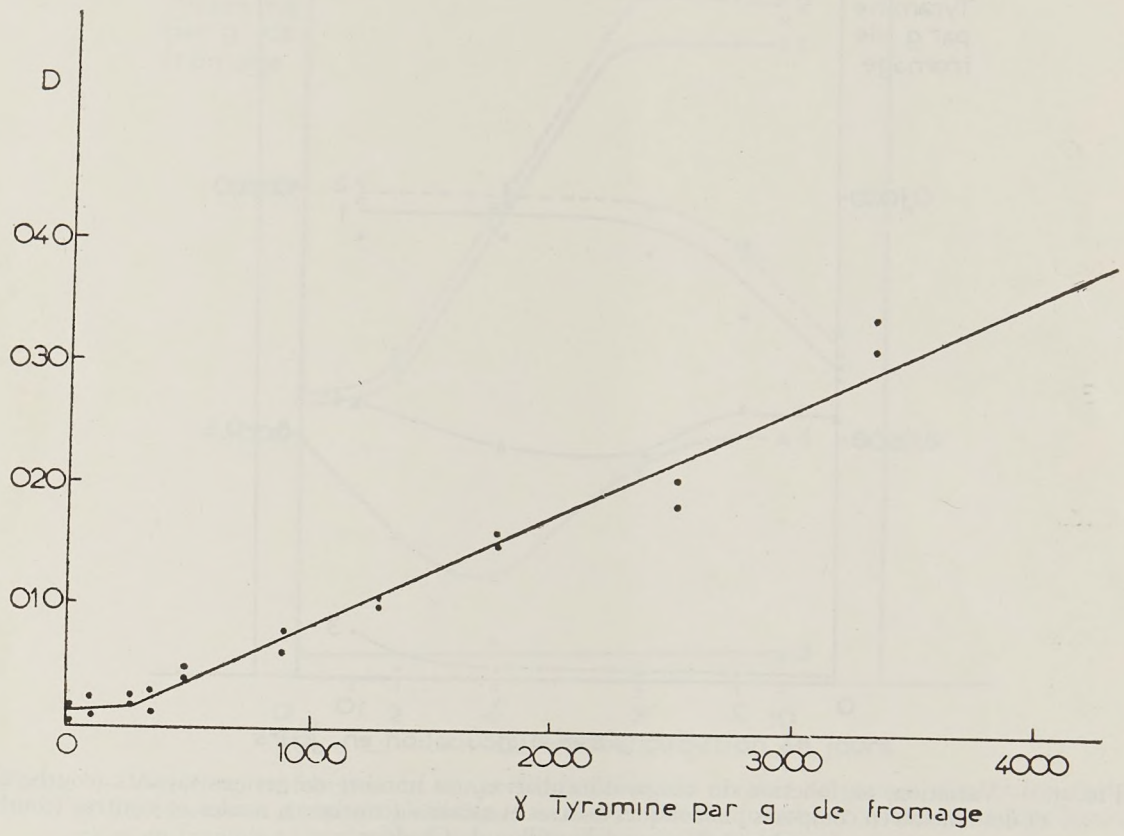


FIG. 2. — Évaluation, en densité optique, de la tyramine extraite en milieu acide.

a) Cas du Cheddar [1]

La figure 3 montre que seule une décarboxylation discrète de la tyrosine se manifeste après 2 jours d'incubation. La comparaison des courbes 1 et 2 ne met pas en évidence la présence de composés phénoliques neutres. La teneur en composés phénoliques acides (courbe 3) est très faible et n'augmente pas d'une manière significative. Enfin la courbe 4 indique l'absence de prolifération bactérienne. Elle montre aussi que la décarboxy-

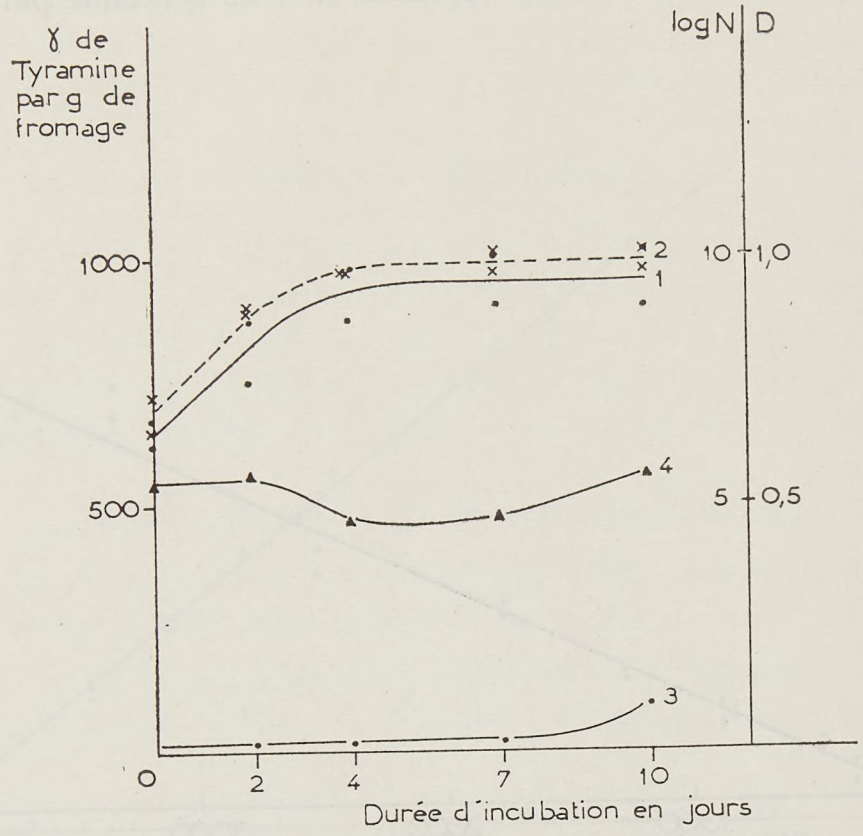


FIG. 3. — Variation, en fonction du temps d'incubation, du nombre de germes vivants (courbe 4), et des teneurs en composés phénoliques neutres et alcalins (courbe 1), acides et neutres (courbe 3) et en tyramine (courbe 2) dans un échantillon de Cheddar.

lation observée pour la tyrosine est due aux systèmes enzymatiques du fromage, puisqu'elle se produit déjà après deux jours d'incubation alors que le nombre de bactéries vivantes n'a pas varié.

b) Cas du Roquefort.

La courbe 2 de la figure 4 montre la présence de décarboxylases dont l'activité sur la tyrosine est manifeste dès le 2e jour d'incubation. On constate (courbe 4) un certain développement microbien à partir du 4e jour mais sans rapport, semble-t-il, avec la décarboxylation : en effet, il commence après 4 jours d'incubation, se poursuit après 7 jours alors

(1) Échantillon de fromage fabriqué au *Dairy département* de l'Université de Cornell, U. S. A.

que la teneur en tyramine ne varie plus. Les différences entre les courbes 1 et 2 sont imputables à l'extraction partielle de la tyramine en milieu acide : les composés phénoliques neutres ne peuvent donc être mesurés. La courbe 3 indique une certaine teneur en composés phénoliques acides et neutres mais aucune variation de cette teneur durant les 10 jours d'incubation. La seule activité enzymatique, liée aux systèmes enzymatiques du fromage, est donc une décarboxylation active de la tyrosine.

Intéresse-t-elle toute la tyrosine du substrat? Lorsque le filtrat a

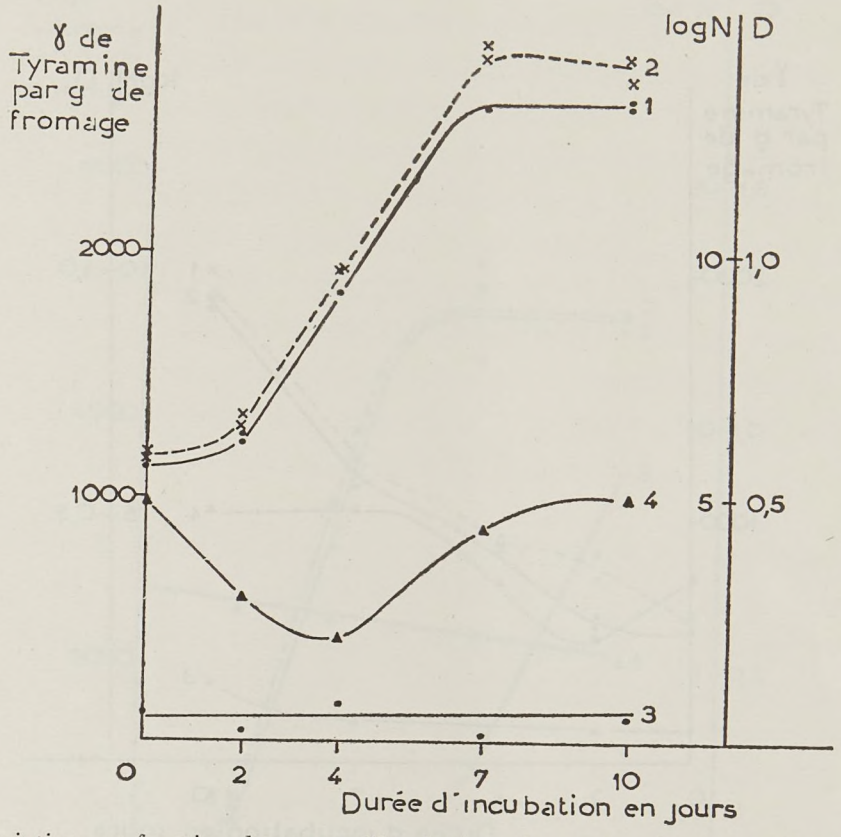


FIG. 4. — Variation, en fonction du temps d'incubation, du nombre de germes vivants (courbe 4), et des teneurs en composés phénoliques neutres et alcalins (courbe 1), acides et neutres (courbe 3) et en tyramine (courbe 2) dans un échantillon de Roquefort.

été dilué selon la technique décrite précédemment, il contient 3 200 γ de tyrosine par g de fromage. Une décarboxylation totale de cette tyrosine libère, compte tenu des poids moléculaires de la tyrosine et de la tyramine, 2 640 γ de tyramine. Or nous avons observé après 7 jours d'incubation une teneur moyenne en tyramine de 2 800 γ par g de fromage. On peut donc penser que toute la tyrosine du substrat a été effectivement décarboxylée en tyramine.

c) **Cas du Pont l'Évêque.**

La figure 5 montre qu'une partie de la tyrosine peut être dégradée en composés phénoliques neutres : en effet, l'écart entre les courbes 1 et 2, après 2 jours d'incubation, atteint 224 γ, exprimés en γ de tyramine

par g de fromage, pour une teneur moyenne en tyramine de 575 γ, soit 39 p. 100 de la tyramine formée. La figure 2 montre que la quantité de tyramine extraite en milieu acide est très inférieure à 225 γ et ne saurait expliquer cet écart. D'autre part, les écarts expérimentaux que nous avons observés entre les doubles sont de l'ordre de 10 p. 100. L'écart entre les courbes 1 et 2 peut donc être considéré comme significatif. L'apparition de ces composés phénoliques neutres est liée à la présence de systèmes enzymatiques présents dans le fromage, et non à une prolifération microbienne comme l'indique la courbe 4.

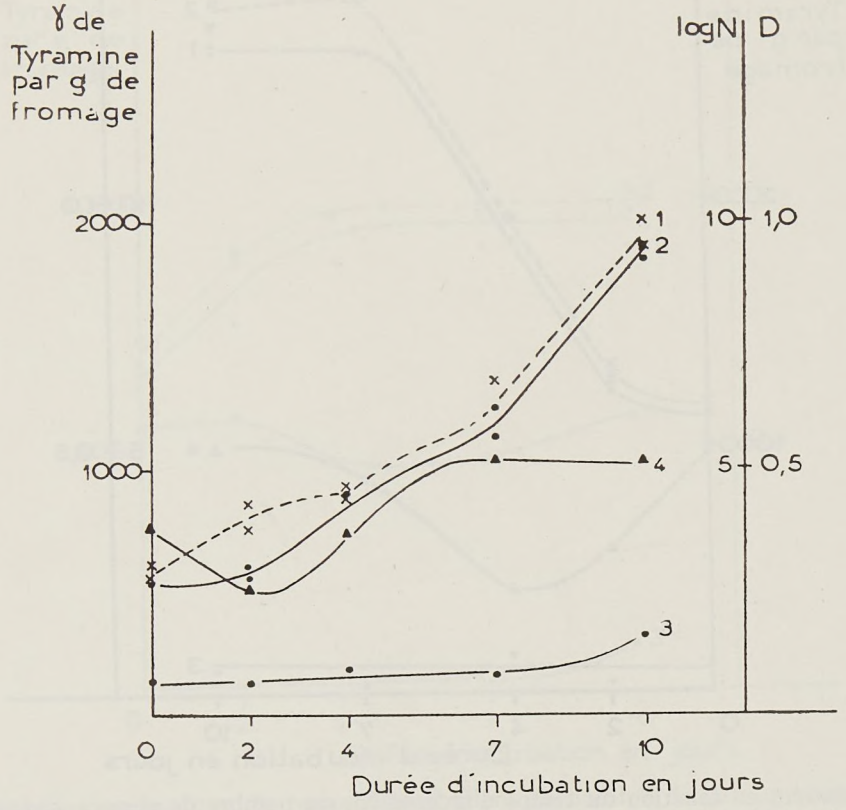


FIG. 5. — Variation, en fonction du temps d'incubation, du nombre de germes vivants (courbe 4), et des teneurs en composés phénoliques neutres et alcalins (courbe 1), acides et neutres (courbe 3) et en tyramine (courbe 2) dans un échantillon de Pont l'Evêque.

Après deux jours d'incubation l'écart entre les courbes 1 et 2 n'est plus significatif. L'activité de ces systèmes enzymatiques est alors masquée par l'activité des décarboxylases de la tyrosine. La courbe 4 fait apparaître entre le deuxième et le septième jour d'incubation une certaine prolifération bactérienne. Cependant la comparaison des courbes 2 et 4 permet de penser que cette décarboxylation est bien due aux systèmes enzymatiques du fromage, puisqu'elle se poursuit après 7 jours d'incubation en l'absence de toute prolifération bactérienne.

La teneur en composés phénoliques extraits en milieu acide est assez élevée, comme le montre la courbe 3, mais, comme dans le cas précédent, elle n'augmente pas d'une manière appréciable au cours de l'incubation.

d) Cas du Carré de l'Est.

La figure 6 donne un exemple typique de l'activité des systèmes enzymatiques qui peuvent être présents dans les fromages : en l'absence de tout développement microbien (courbe 4) on assiste à une augmentation importante de la tyramine (courbe 2) qui se manifeste dès le deuxième jour d'incubation. Elle diminue ensuite à partir du quatrième

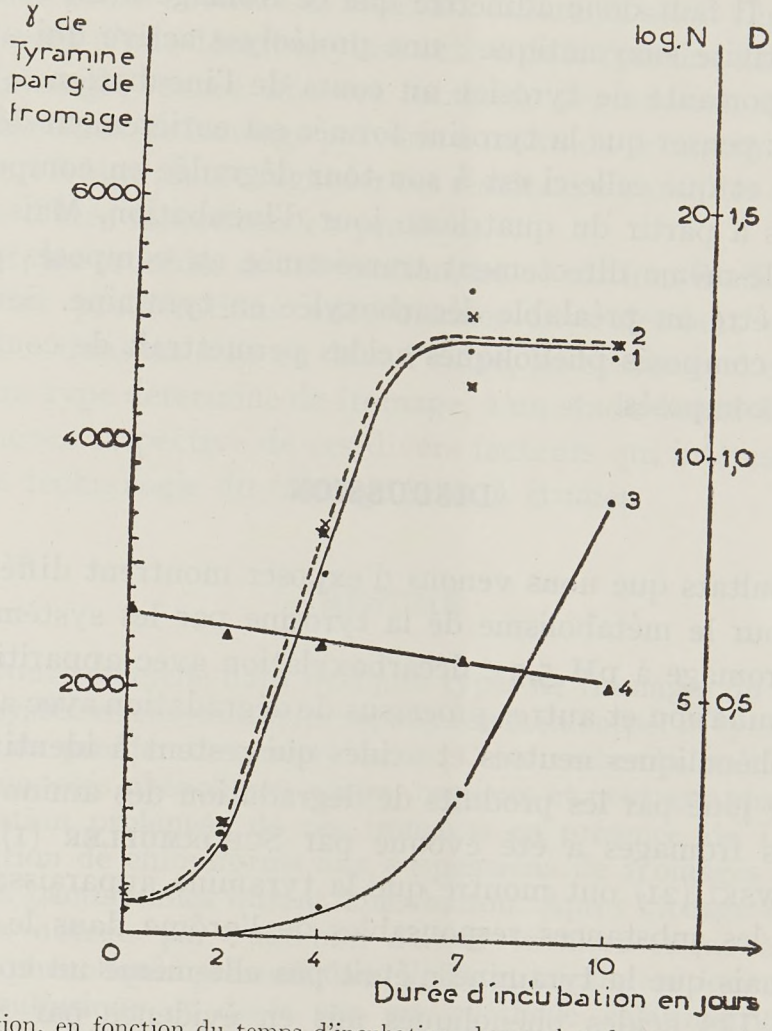


FIG. 6. — Variation, en fonction du temps d'incubation, du nombre de germes vivants (courbe 4), et des teneurs en composés phénoliques neutres et alcalins (courbe 1), acides et neutres (courbe 3) et en tyramine (courbe 2) dans un échantillon de Carré de l'Est.

jour, tandis qu'augmente la teneur en composés phénoliques extraits en milieu acide (courbe 3).

Deux activités enzymatiques se manifestent donc d'une façon particulièrement nette : décarboxylation de la tyrosine en tyramine et désamination de la tyramine en composés phénoliques acides. Les composés neutres, par contre, ne sont pas formés en quantités mesurables. En effet, les faibles différences constatées entre les courbes 1 et 2 sont imputables à l'extraction partielle de la tyramine en milieu acide.

Au septième jour d'incubation, la teneur en tyramine atteint 5 100 γ par g de fromage. Or, nous avons vu précédemment que la décarboxylation totale de la tyrosine du substrat-tyrosine libère 2 640 γ de tyramine par g de fromage. 48 p. 100 de la tyrosine décarboxylée viennent donc du fromage lui-même ; or, les dosages de tyrosine nous ont montré que dans le filtrat trichloracétique témoin, obtenu à partir de la suspension de Carré de l'Est non incubée, la teneur en tyrosine était celle du substrat-tyrosine : il n'y a pas eu apport de tyrosine libre par le fromage avant l'incubation. Il faut donc admettre que ce fromage a été le siège d'une troisième activité enzymatique : une protéolyse active qui a libéré une quantité importante de tyrosine au cours de l'incubation.

On peut penser que la tyrosine formée est entièrement décarboxylée en tyramine et que celle-ci est à son tour dégradée en composés phénoliques acides à partir du quatrième jour d'incubation. Mais la tyrosine peut être elle-même directement transformée en composés phénoliques acides sans être au préalable décarboxylée en tyramine. Seule l'identification des composés phénoliques acides permettrait de connaître l'origine de ces composés.

DISCUSSION

Les résultats que nous venons d'exposer montrent différentes voies possibles pour le métabolisme de la tyrosine par les systèmes enzymatiques du fromage à pH 5,5 : décarboxylation avec apparition de tyramine, désamination et autres processus de dégradation avec apparition de composés phénoliques neutres et acides qui restent à identifier.

Le rôle joué par les produits de dégradation des amino-acides dans l'arôme des fromages a été évoqué par Schormüller (1). Dahlberg et Kosikowski (21) ont montré que la tyramine apparaissait en même temps que les substances responsables de l'arôme dans le fromage de Cheddar, mais que la tyramine n'était pas elle-même un constituant de cet arôme. Les acides phénoliques mis en évidence par Simonart et Mayaudon (18) et les composés phénoliques neutres et acides que nous avons dosés globalement constituent peut-être un des éléments de l'arôme proprement dit.

La genèse de ces composés phénoliques dans les fromages peut être liée à la seule présence de systèmes enzymatiques actifs comme le montre, d'une façon particulièrement nette, la figure 6. En l'absence de tout développement bactérien, des protéinases actives à pH 5,5 — que Schormüller (13) a déjà mises en évidence — libèrent de la tyrosine. Elle sert de substrat aux décarboxylases qui libèrent de la tyramine. Puis la tyramine formée, ou la tyrosine elle-même, sont ensuite dégradées par des désaminases encore actives à pH 5,5 qui libèrent des composés phéno-

liques neutres ou acides. Dans les conditions naturelles, le pH de certains fromages peut devenir neutre et même alcalin au cours de la maturation. L'activité des désaminases doit alors se manifester plus tôt et plus complètement que dans les conditions de nos essais.

Les différences d'activité enzymatique entre les échantillons de fromage examinés dans notre étude sont importantes mais il serait prématuré de les considérer comme un caractère qui pourrait servir à définir un type déterminé de fromage, par exemple le Carré de l'Est. Ainsi pour le Cantal nous avons obtenu des résultats différents selon l'âge des échantillons : présence d'une décarboxylase active de la tyrosine dans des échantillons de fromages jeunes, absence totale de dégradation de la tyrosine dans un échantillon de fromage parvenu à un stade de maturation avancé. Pour l'instant il faut plutôt regarder ces résultats comme des cas possibles, susceptibles d'être rencontrés en pratique.

En effet, les procédés de fabrication, les conditions d'affinage et enfin la nature des proliférations microbiennes interviennent certainement pour modifier, dans un sens ou dans l'autre, les systèmes d'enzymes présents dans un type déterminé de fromage, à un stade donné de la maturation. L'influence respective de ces divers facteurs qui intéressent au premier chef la technologie du fromage reste à étudier.

RÉSUMÉ

Nous avons recherché dans quelques types de fromages du commerce la présence de systèmes enzymatiques capables de métaboliser la tyrosine à pH 5,5 en l'absence de prolifération microbienne. Cette recherche a été effectuée en dosant les composés phénoliques acides, basiques et neutres apparus au cours d'une incubation prolongée de ces fromages en présence de L(-)tyrosine à 34°C. L'addition de chloroforme aux suspensions de fromages empêche les proliférations bactériennes durant l'incubation. Après blocage des systèmes enzymatiques obtenu par l'addition d'acide trichloracétique à 50 p. 100, les composés phénoliques présents dans le filtrat trichloracétique sont extraits par l'éther sulfurique et dosés par une méthode colorimétrique utilisant la réaction de Millon. Un contrôle bactériologique est effectué au cours de l'incubation sur tous les échantillons analysés.

Les résultats font apparaître dans ces échantillons de fromages diverses éventualités : activité enzymatique faible, décarboxylation active de la tyrosine avec formation de tyramine, dégradation de la tyrosine ou de la tyramine en composés phénoliques acides et neutres, accompagnée ou non d'une protéolyse avec libération de tyrosine.

La nature et le rôle de ces composés phénoliques et de ces systèmes enzymatiques sont discutés.

Reçu pour publication le 30 *janvier* 1959.

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

(1) SCHORMÜLLER (J.), LIESE (H.) et WINTER (H.). — Beiträge zur Biochemie der Käsereifung. III Mitteilung. Das Verhalten des Arginins im Verlauf der Reifung. *Z. Lebensmitt. Untersuch.*, **98**, 347, 1954.

(2) SCHORMÜLLER (J.), BIRN (K. H.) et WINTER (H.). — Beiträge zur Biochemie der Käsereifung. IV Mitteilung. Das Verhalten des Tyrosins in Verlauf der Reifung. *Z. Lebensmitt. Untersuch.*, **98**, 411, 1954.

(3) SCHORMÜLLER (J.), BIRN (K. H.) et WINTER (H.). — Beiträge zur Biochemie der Käsereifung. V Mitteilung. Das Verhalten des Tryptophans im Verlauf der Reifung. *Z. Lebensmitt. Untersuch.*, **99**, 96, 1954.

(4) SCHORMÜLLER (J.). — Beiträge zur Biochemie der Käsereifung. VI Mitteilung. Methionin, Cystin und Schwefelwasserstoffschwefel im Verlaufe der Reifung. *Z. Lebensmitt. Untersuch.*, **99**, 214, 1954.

(5) SILVERMAN (G. J.) et KOSIKOWSKI (F. V.). — Tyrosine in Cheddar cheese. *J. Dairy Sci.*, **38**, 950, 1955.

(6) KOSIKOWSKI (F. V.). — Paper partition chromatography of the free amino acids in American Cheddar cheese. *J. Dairy Sci.*, **34**, 228, 1951. The liberation of free amino acids in raw and pasteurized milk cheese during ripening. *J. Dairy Sci.*, **34**, 235, 1951.

(7) BLOCK (R. J.). — The estimation of amino acids and amines on Paper Chromatograms. *Analyt. Chem.*, **22**, 1327, 1950.

(8) MABBITT (L. A.). — Quantitative estimation of the amino acids in Cheddar cheese and their importance in flavour. *J. Dairy Res.*, **22** (2), 224, 1955.

(9) BULLOCK (D. H.), IRVINE (O. R.) et SPROULE (W. H.). — Determination of free amino acids in Cheddar cheese by one dimensional paper chromatography. *J. Dairy Sci.*, **38**, (6), 589, 1955.

(10) TUCKY (S. L.) et SAHASRABUDHE (M. R.). — Studies in the ripening of surface ripened cheese. *J. Dairy Sci.*, **38** (6), 589, 1955.

(11) WILSSENS (A.) et VLEESCHAUWER (A. de). — Assay of amino acids in cheese by chromatographic and microbiological methods. *Meded. Landbhogesch. Gent.*, **19** (4), 689, 1954.

(12) CLEMENS (W.). — Papier chromatographische Untersuchungen an Käse. *Milchwissenschaft*, **9** (6), 195, 1954.

(13) SCHORMÜLLER (J.), WIESKE (R.) et WINTER (H.). — Beiträge zur Biochemie der Käsereifung. VIII Mitteilung. Die Proteinasen des Sauermilchkäses und deren Aktivität im Verlauf der Reifung. *Z. Lebensmitt. Untersuch.*, **99**, 437, 1954.

(14) SCHORMÜLLER (J.), WIESKE (R.) et WINTER (H.). — Beiträge zur Biochemie der Käsereifung. IX Mitteilung. Die Peptidasen des Sauermilchkäses und deren Aktivität im Verlauf der Reifung. *Z. Lebensmitt. Untersuch.*, **100**, 35, 1955.

(15) SCHORMÜLLER (J.) et GELLRICH (W.). — Beiträge zur Biochemie der Käsereifung. XI Mitteilung. Transaminasen Reaktionen im reifenden Sauermilchkäse unter besonderer Berücksichtigung des Glutaminsäure-Asparaginsäuresystems. *Z. Lebensmitt. Untersuch.*, **100**, 200, 1955.

(16) SCHORMÜLLER (J.) et MÜLLER (H.). — Beiträge zur Biochemie der Käsereifung. XII Mitteilung. Ueber die Spaltung synthetischer Prolylpeptide durch Prolinase aus Sauermilchkäse. *Z. Lebensmitt. Untersuch.*, **100**, 380, 1955.

(17) KOSIKOWSKI (F. V.) et DAHLBERG (A. C.). — The tyramine content of cheese. *J. Dairy Sci.*, **31** (4), 293, 1948.

(18) SIMONART (P.) et MAYAUDON (J.). — Sous presse.

(19) GALE (E. F.). — Chapter on the bacterial amino acids decarboxylases in « Advances in Enzymology » 1946, **6**, 1-32. Edited by F. F. Nord, Interscience Publishers Inc., New York, N. Y.

(20) BELLAMY (W. D.) et GUNSALUS (I. C.). — Growth requirements of *Streptococcus faecalis* for tyrosine decarboxylation. *J. Bact.*, **46**, 573, 1943.

(21) SILVERMAN (G. J.) et KOSIKOWSKI (F. V.). — A bacterial enzymatic method for determining tyrosine in cheese. *J. Dairy Sci.*, **38** (9), 941, 1955.

(22) DAHLBERG (A. C.) et KOSIKOWSKI (F. V.). — The relationship of the amount of tyramine and the numbers of *Streptococcus faecalis* to the intensity of flavor in American Cheddar cheese. *J. Dairy Sci.*, **31** (4), 305, 1948.

LA RECHERCHE DU LAIT DE VACHE AJOUTÉ AU LAIT DE CHÈVRE. APPLICATION AU CAS DU FROMAGE

PAR

S. KUZDZAL-SAVOIE et W. KUZDZAL

Station Centrale de recherches laitières,
et de Technologie des produits animaux, Jouy-en-Josas.

I. — INTRODUCTION

Une proportion d'acides gras volatils élevée et nettement supérieure à celle de la matière grasse du lait de vache caractérise la matière grasse du lait de chèvre. Utilisant cette propriété, CHOLLET et CAMUS (1) d'une part et LOPEZ (2) d'autre part, ont proposé deux méthodes permettant de déceler la présence de lait de vache dans le lait de chèvre. La méthode de CHOLLET et CAMUS (1) a été également appliquée à l'étude des fromages de chèvre.

Une méthode sérologique a été proposée, en 1952, par HADLAND et SOLBERG (3). Elle permet de déceler la présence de 1 p. 100 de lait de vache dans le lait de chèvre, qu'il s'agisse de lait entier ou de lait écrémé. Cependant cette méthode ne paraît pas jusqu'à maintenant être applicable au fromage.

La méthode que nous proposons ci-dessous (applicable au lait et au fromage) repose sur l'observation suivante : le lait de chèvre ne contient pas de β carotène (4), alors que ce pigment liposoluble est au contraire toujours présent dans le lait de vache. Le colostrum de chèvre peut contenir du β carotène (4) mais ceci ne représente pas un inconvénient sérieux, le colostrum ne devant pas être incorporé au lait commercialisé.

La méthode est applicable au fromage car il a été établi (5) que la concentration en carotène du fromage ne varie pas sensiblement au cours de l'affinage.

Ainsi il suffit de s'assurer de l'absence de β carotène dans le lait ou le fromage de chèvre pour affirmer qu'il s'agit de produits « pur chèvre ».

II. — JUSTIFICATION DE LA MÉTHODE

Le β carotène en solution dans l'hexane possède un spectre d'absorption caractérisé par trois maxima correspondant aux longueurs d'onde suivantes : 425 mμ, 450 mμ, 477 mμ. Le pic que présente la courbe d'absorption à 450 mμ est particulièrement net.

La coloration de la matière grasse du lait de vache est due principalement au β carotène. Si l'on mesure l'absorption en lumière visible

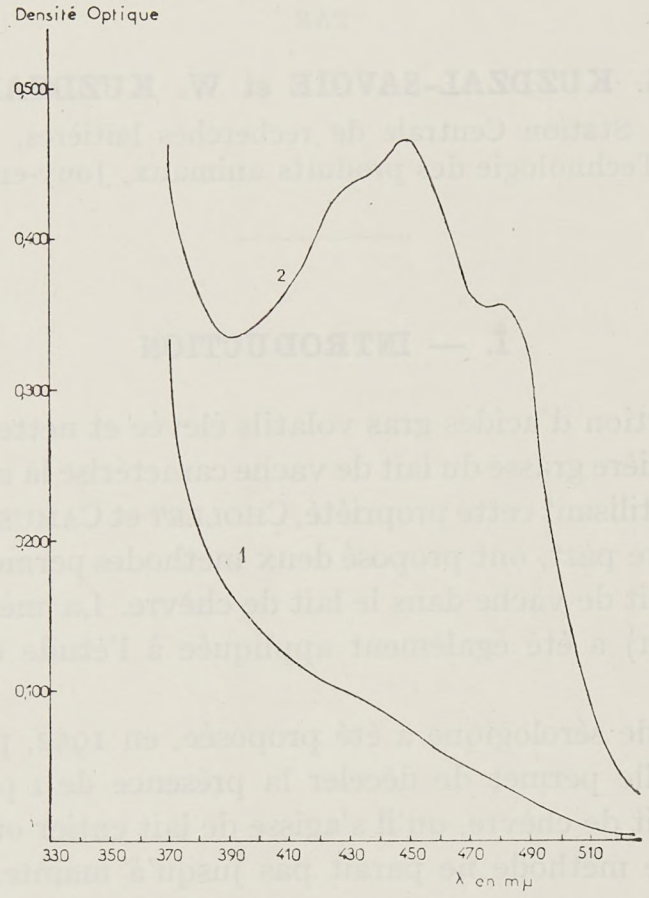


FIG. 1. — Spectres d'absorption de solutions de matière grasse dans l'hexane. 1 : lait de chèvre. — 2 : lait de vache.

de la matière grasse du lait de vache en solution dans un solvant organique (5 g de matière grasse dans 10 ml d'hexane), on retrouve le spectre caractéristique du β carotène. Si l'on effectue la même mesure sur la matière grasse de lait de chèvre on ne voit apparaître aucun pic, (absence de β carotène).

La figure 1 montre l'aspect des courbes obtenues.

On peut ainsi mettre en évidence, très rapidement, la présence de lait de vache dans le lait de chèvre par la simple observation du spectre de la matière grasse : il suffit en effet de noter l'amorce du spectre caractéristique du β carotène pour affirmer la présence de lait de vache.

Cette méthode présente cependant deux inconvénients : tout d'abord elle nécessite l'utilisation d'un spectrophotomètre et ensuite, le fonds spectral obtenu est très important.

Pour pallier le premier inconvénient, on a pensé qu'un dosage colorimétrique de l'insaponifiable de la matière grasse de lait de vache ou de lait de chèvre pouvait conduire à des résultats intéressants. En fait l'insaponifiable de la matière grasse de lait de chèvre est toujours coloré, quoique faiblement par rapport à l'insaponifiable de la matière grasse de lait de vache. En se basant, pour évaluer le contenu en carotène sur une courbe d'étalonnage établie à partir d'une solution chloroformique de β carotène pur (HOFFMANN-LAROCHE) à des concentrations variables (lectures au colorimètre tricellule JOBIN et YVON), on a trouvé en août 1955 sur des laits de mélange provenant d'une part du troupeau de chèvres et d'autre part du troupeau de vaches élevés au Centre National de Recherches Zootechniques, une valeur correspondant à 30-50 μg de β carotène p. 100 g de matière grasse du lait de chèvre contre 620 à 650 μg pour 100 g de matière grasse de lait de vache. Une extraction supplémentaire de l'insaponifiable par l'alcool méthylique à 90 p. 100 (v/v) (6) destinée à séparer les caroténols (xanthophylles en particulier) n a pas permis d'éliminer cette légère coloration. Nous avons donc finalement adopté une méthode de séparation chromatographique de l'insaponifiable sur colonne d'alumine, avec élutions successives par des solvants différents (7). Cette méthode permet d'isoler le β carotène des autres constituants colorés de l'insaponifiable ; le β carotène est en effet le premier composé coloré élué. On peut ensuite, soit étudier le spectre d'absorption (de 350 à 500 mμ) de la solution obtenue, soit plus simplement mesurer son absorption avec un écran bleu au photocolorimètre.

Dans l'application que nous avons faite de cette méthode, nous avons utilisé la spectrophotométrie. On obtient des spectres d'absorption bien caractérisés, avec un fond spectral réduit au minimum.

III. — TECHNIQUE EXPÉRIMENTALE

Le β carotène est isolé de l'insaponifiable de la matière grasse du lait, du beurre ou du fromage, par chromatographie d'adsorption sur colonne d'alumine. Il est ensuite caractérisé par son spectre d'absorption en lumière visible.

Il est donc nécessaire de réaliser les opérations suivantes : saponification de la matière grasse, extraction de l'insaponifiable, chromatographie sur alumine, mesure de l'absorption de la solution de β carotène par spectrophotométrie.

A. — Saponification.

La saponification peut être effectuée soit directement, soit indirectement, après extraction de la matière grasse.

1. — Cas du lait :

a) Saponification directe (8) : mesurer 100 ml de lait, les verser dans un erlenmeyer de 500 ml. D'autre part dissoudre 20 g de potasse caustique en pastilles dans un mélange de 10 ml d'eau distillée et 100 ml d'alcool éthylique. Verser cette solution dans l'erlenmeyer contenant le lait. Agiter légèrement et porter à ébullition modérée au bain-marie sous réfrigérant à reflux. Maintenir l'ébullition pendant deux heures. Laisser refroidir.

b) Saponification indirecte : après écrémage du lait et fabrication du beurre (voir cas du beurre).

2. — Cas du beurre : peser 5 g de matière grasse obtenue après fusion et centrifugation du beurre. Ajouter 25 ml d'une solution alcoolique de potasse environ 2N et saponifier comme précédemment.

3. — Cas du fromage :

a) Saponification directe : peser un poids de fromage correspondant à environ 5 g de matière grasse dans un erlenmeyer de 500 ml. Ajouter 30 g de potasse caustique en pastilles, préalablement dissous dans 15 ml d'eau distillée et 150 ml d'alcool éthylique. Saponifier au bain-marie comme précédemment.

b) Saponification indirecte : on extrait la matière grasse du fromage par la méthode de Soxhlet à l'éther de pétrole après avoir intimement mélangé le fromage à son poids de sulfate de soude anhydre et à son poids de sable de Fontainebleau. Après extraction pendant 24 heures, on filtre l'extrait éthéré. Le solvant est évaporé si nécessaire et on amène la solution à un volume de 100 ml, avec l'éther de pétrole. On prélève trois fois 5 ml qu'on laisse écouler dans trois capsules tarées. Ces capsules sont placées dans une étuve Chopin. Le solvant est évaporé à 60°C sous pression réduite (quelques cm de mercure). Le poids d'extrait sec permet de connaître le poids de matière grasse contenue dans le poids de fromage utilisé pour l'extraction. On prélève en même temps 75 ml que l'on place dans un erlenmeyer de 300 ml. Après évaporatoin du solvant on ajoute 25 ml de potasse alcoolique 2N environ et l'on porte au bain-marie ; on amène à ébullition et on maintient l'ébullition pendant deux heures.

B. — Extraction de l'insaponifiable.

On peut extraire l'insaponifiable soit directement sur le produit résultant de la saponification, (cas du lait et du fromage ayant subi l'attaque alcaline), soit après avoir amené la solution de savon aux proportions

fixées par LEMELAND (9), c'est-à-dire alcool à 50 p. 100 et potasse 0,1 N. Ceci est aisé à réaliser lorsqu'on a utilisé la solution de potasse environ 2N pour la saponification. Il suffit en effet de neutraliser l'excès de potasse, avec l'acide chlorhydrique environ N, d'ajouter ensuite une quantité de potasse permettant d'obtenir le titre 0,1N et d'amener la solution au volume final choisi (avec de l'eau et éventuellement de l'alcool). La solution de savon est alors épuisée par trois fois 50 ml d'éther de pétrole. Les extraits éthérés sont réunis et lavés à l'eau avec faible agitation. On ajoute ensuite environ 10 g de sulfate de soude anhydre à la solution d'insaponifiable et après une heure de contact la solution est filtrée et le solvant évaporé, jusqu'à volume réduit (quelques ml). L'insaponifiable est repris par l'éther de pétrole et transvasé en capsule tarée. L'évaporation est terminée à la température ambiante au dessicateur sous vide. L'insaponifiable est aussitôt pesé et repris par quelques ml d'hexane (le moins possible).

C. — Chromatographie.

La méthode de séparation chromatographique du β carotène est celle décrite par THOMPSON et KON (7). On utilise de l'alumine standardisée selon BROCKMAN. Cette alumine est activée par passage de quelques heures au four (par exemple un passage de 6 heures à 600°C, suivi d'une réhumidification à 4 p. 100 (p/p).

La colonne est un tube de verre de 13 cm de long et de 1,3 cm de diamètre intérieur. Ce tube est prolongé par un petit tube de 0,4 cm de diamètre intérieur et de 3 ou 4 cm de long. Cette colonne est montée sur une fiole à vide. On place à la base de la colonne un tampon de coton hydrophile de 1 cm de haut et l'on verse l'alumine en suspension dans l'hexane. On laisse écouler librement. La hauteur de la colonne d'alumine doit atteindre 4 cm. Une rondelle de papier filtre est placée sur la colonne. La surface de la colonne doit toujours être couverte de solvant.

On verse à la pipette la solution d'insaponifiable. On la laisse pénétrer dans la colonne. On rince ensuite les bords de la colonne par de l'hexane et l'on fait passer encore quelques ml d'hexane.

On élue ensuite dans une fiole propre, le β carotène entraîné sélectivement sous forme d'un anneau orange, par une solution d'hexane contenant 0,75 p. 100 (v/v) d'acétone. On arrête l'élution après passage de l'anneau orange. Lorsque l'analyse est effectuée sur du lait ou du fromage de chèvre, on ne voit pas cet anneau orange.

D'autres anneaux colorés restent sur le sommet de la colonne et ne sont élués qu'avec de l'hexane contenant 3 p. 100 (v/v) d'acétone ou 8 p. 100 d'éthanol (v/v).

Ces autres anneaux colorés sont identiques pour les deux espèces

chèvre et vache. Ils sont jaunes dans le cas du lait et jaune, rose et brun dans celui du fromage.

Après évaporation du solvant on reprend le résidu par l'hexane pur et on amène à un volume de 10 ou 20 ml suivant la concentration.

D. — Mesure spectrophotométrique.

L'absorption de la solution est mesurée de 350 mμ à 500 mμ (spectrophotomètre Beckman D. U., cuve de 1 cm).

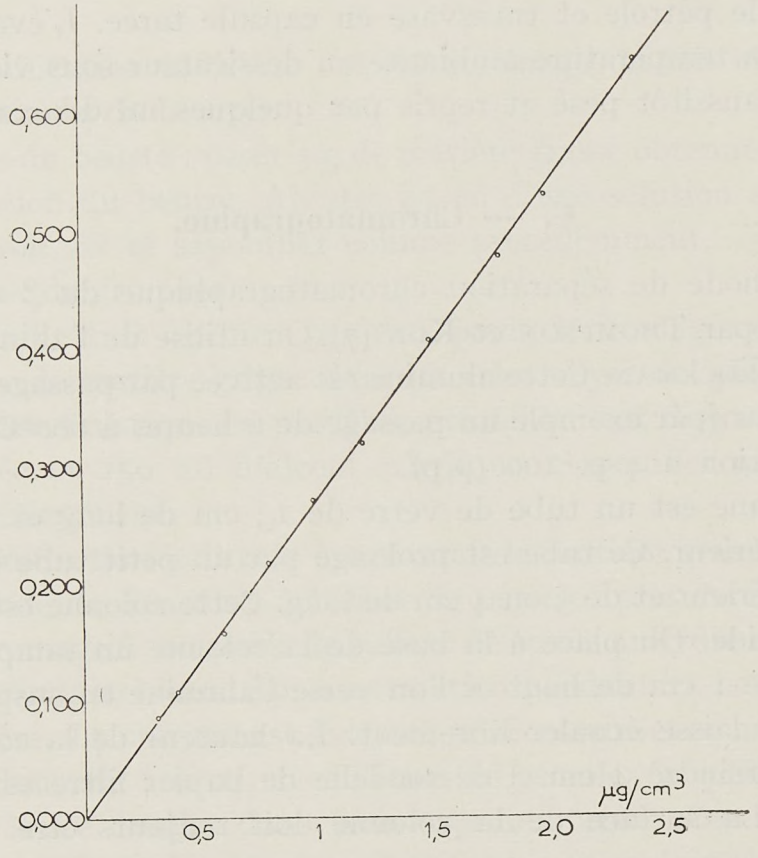


FIG. 2. — Courbe d'étalonnage : densités optiques mesurées à 4 500 Å. Solutions à concentrations variables de β carotène (HOFFMANN-LAROCHE).

La forme de la courbe d'absorption obtenue permet de reconnaître la présence ou l'absence de β carotène.

Pour déterminer la concentration en β carotène on observe la valeur de la densité optique au maximum de la courbe, et l'on se reporte à une courbe d'étalonnage établie en mesurant à 450 mμ l'absorption de solutions de β carotène pur (HOFFMANN-LAROCHE) de concentrations variables, de 0, à 2 μg par ml de solution. Pour ces faibles concentrations, l'absorption est proportionnelle à la concentration et la courbe d'étalonnage est une droite (fig. 2).

E. — Mesure colorimétrique.

Elle peut être utilisée si l'on ne dispose pas de spectrophotomètre On examine la solution d'hexane contenant ou non du β carotène sous écran bleu. La concentration en β carotène est déterminée par référence à une courbe d'étalonnage.

F. — Expression des résultats.

Les résultats sont exprimés en mg ou μg de β carotène p. 100 g de matière grasse. Dans les cas où l'on utilise la saponification directe il est donc nécessaire de déterminer sur un autre échantillon le taux de matière grasse du produit étudié (lait ou fromage).

Remarque : Le carotène s'oxyde facilement. Sa coloration disparaît alors. Le contact de l'air, l'exposition à la lumière, les températures élevées l'acidité du milieu favorisent cette oxydation. Les opérations du dosage ci-dessus décrit doivent donc être menées le plus possible à l'abri de la lumière ; le temps pendant lequel le carotène se trouve non dissous doit être réduit au maximum ; l'eau du bain-marie utilisée pour la saponification est portée à une température voisine de 85°C.

IV. — APPLICATION DE LA MÉTHODE

A. — Dosage de β carotène dans le lait.

Les échantillons sont constitués par des laits de mélange provenant d'une part du troupeau de chèvres et d'autre part du troupeau de vaches élevés au Centre National de Recherches Zootechniques. Le β carotène est dosé après saponification directe de la matière grasse du lait.

Le 20 janvier 1958 le lait de vache contenait 180 μ g de β carotène par litre de lait ou 493 μg de β carotène p. 100 g de matière grasse.

Les spectres d'absorption obtenus sont représentés sur la figure 3.

B. — Dosage de β carotène dans le beurre.

On prépare du beurre de vache et du beurre de chèvre. Après fusion et centrifugation séparées de ces deux beurres, on pèse quatre échantillons de matière grasse (les échantillons I, II, III et IV) sur lesquels on dose le β carotène. La nature des échantillons et les résultats de l'analyse sont indiqués dans le tableau I. Les spectres d'absorption sont représentés sur la figure 4.

On retrouve dans les échantillons II et III, avec une erreur relative

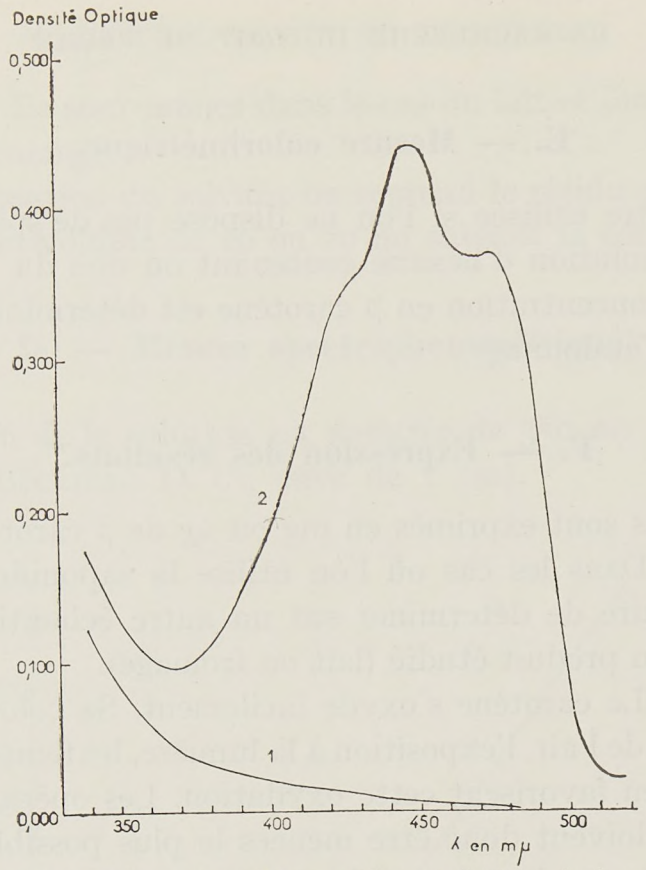


FIG. 3. — Spectres d'absorption d'éluats d'insaponifiables de la matière grasse de lait de chèvre (1) et de lait de vache (2).

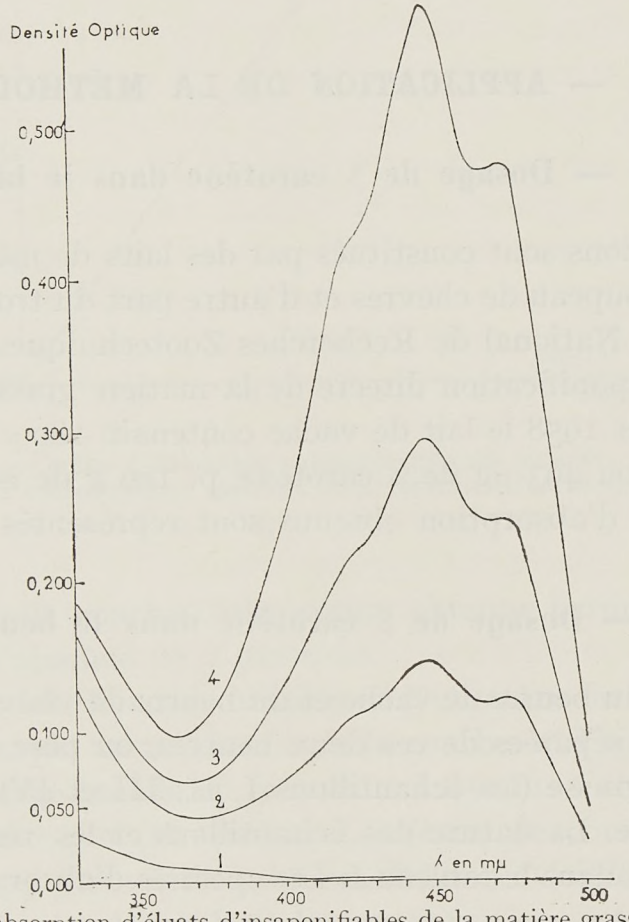


FIG. 4. — Spectres d'absorption d'éluats d'insaponifiables de la matière grasse du beurre. 1 : beurre de chèvre pur (échantillon I). — 2 et 3 : beurre de chèvre et de vache mélangés (échantillons II et III). — beurre de vache pur (échantillon IV).

de l'ordre de 1 p. 100, les quantités de β carotène calculées. On utilise pour ce calcul la quantité de β carotène dosée dans l'échantillon IV : beurre de vache.

TABLEAU I

Dosage de β carotène dans le beurre

	Poids (en g) de matière grasse de lait		Quantité de β carotène exprimée en μg p. 100 g de matière grasse		erreur relative %
	de chèvre	de vache	dosée	calculée	
Echantillon I.....	5	0	0		
Echantillon II....	3,750	1,280	119,3	120,3	0,9
Echantillon III....	2,501	2,556	237,3	240,3	1,3
Echantillon IV....	0	5	470,0		

C. — Dosage de β carotène dans le fromage.

On détermine le taux butyreux du lait de vache et du lait de chèvre purs dont on dispose. On incorpore ensuite à deux échantillons de lait de chèvre, des quantités de lait de vache variables avec le taux butyreux des deux laits, mais calculées de telle façon que l'on obtienne, d'une part un lait dont la matière grasse est constituée par 25 parties, de matière grasse de vache et 75 parties de matière grasse de chèvre (mélange II), et, d'autre part, un lait dont la matière grasse est constituée en parties égales de matière grasse de chèvre et de matière grasse de vache (mélange III).

A partir de ces quatre échantillons de lait (lait de chèvre pur (I), lait de vache pur (IV), mélanges II et III) on fabrique des fromages suivant la technique habituelle de fabrication des fromages de chèvre à la ferme.

Le tableau II rend compte des résultats obtenus au cours de trois expériences (A, B, C). Dans les expériences A et B la matière grasse sur laquelle est effectué le dosage de β carotène est extraite des fromages (20 g) par la méthode de SOXHLET (à l'éther de pétrole). Dans l'expérience C, le taux de matière grasse est déterminé par une méthode butyrométrique (VAN GULIK) et le dosage du β carotène est effectué en utilisant la méthode de saponification alcaline directe (sur 10 g de fromage).

Les spectres d'absorption étudiés sont portés sur les figures 5 (expérience A), 6 (expérience B) et 7 (expérience C). Le dosage du β carotène est effectué sur un poids variable de matière grasse. C'est pourquoi sur les figures 5, 6 et 7, les rapports des ordonnées des courbes 2 et 3 à l'ordonnée de la courbe 4 (évaluées au maximum d'absorption) ne sont qu'approximativement égaux à 25 et 50 p. 100.

TABLEAU II

Teneur en β carotène de fromages fabriqués avec des laits de vache et de chèvre, purs ou mélangés.

1re partie : modalités de fabrication des fromages

	Date de fabrication des fromages	Taux butyreux du lait		Quantité de lait (en litres) mis en œuvre dans la fabrication des fromages				
		Chèvre	Vache		I (pur)	II (mélangé)	III (mélangé)	IV (pur)
Expérience A	21-10-57	34	40	lait de chèvre lait de vache	2 0	1,5 0,425	1 0,85	0 2
Expérience B	9-12-57	42,5	32,5	lait de chèvre lait de vache	1 0	0,75 0,327	0,5 0,653	0 1
Expérience C	21-10-57	34	40	lait de chèvre lait de vache	2 0	1,5 0,425	1 0,85	0 2

2e partie : résultats de l'analyse

	Date de l'analyse des fromages affinés	Quantité de β carotène exprimée en µg pour 100 g de matière grasse						Erreur relative %	
		dosée				calculée			
		I (chèvre)	II (mélangé)	III (mélangé)	IV (vache)	II (1)	III (1)	II	III
Expérience A	15-11-57	0	118,5	247,2	509,6	127,4	254,8	— 7,0	— 3,0
Expérience B	17-12-57	0	116,0	220,6	493,0	123,2	246,5	— 5,7	— 10,5
Expérience C	28-1-58	0	73,5	168,4	327,6	81,9	163,8	— 10,2	+ 2,7

(1) La matière grasse du lait, ayant servi à la fabrication des fromages II et III contient, respectivement, 25 et 50 % de matière grasse de lait de vache; par conséquent le taux de β carotène de la matière grasse des fromages II et III devrait correspondre à 25 et 50 % du taux de β carotène de la matière grasse du fromage fabriqué à partir de lait de vache pur.

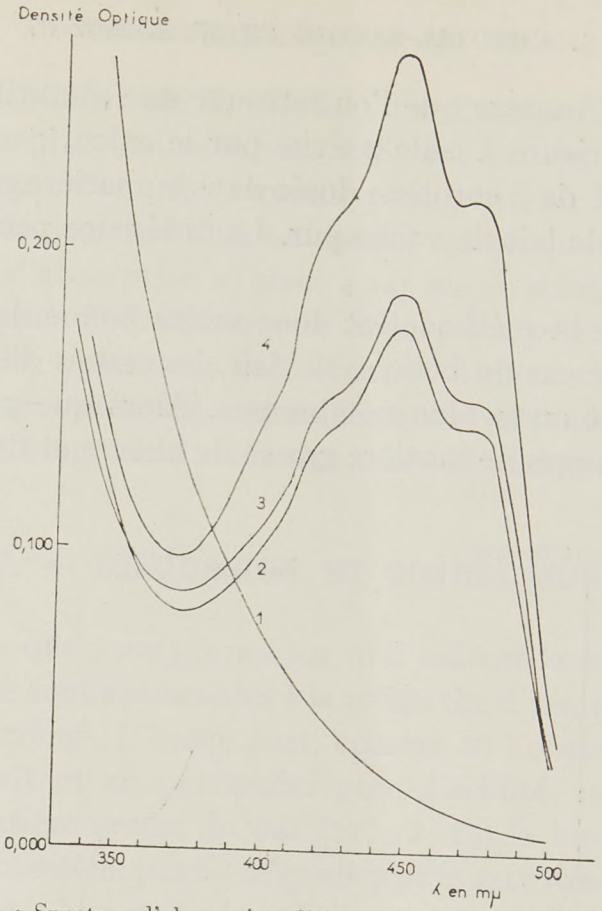


FIG. 5. — *Expérience A* : Spectres d'absorption d'éluats d'insaponifiables de la matière grasse de fromages fabriqués. 1 : avec du lait de chèvre pur (I). — 2 : avec du lait de mélange (II). — 3 : avec du lait de mélange (III). — 4 : avec du lait de vache pur (IV). — Nota : éluats 1 et 2 repris par 10 ml d'hexane ; éluats 3 et 4 repris par 20 ml d'hexane.

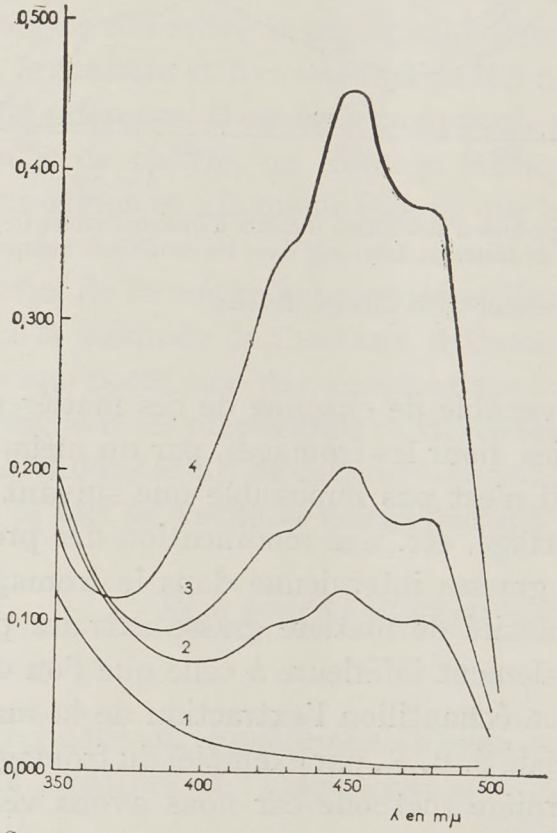


FIG. 6. — *Expérience B* : Spectres d'absorption d'éluats d'insaponifiables (repris par 10 ml d'hexane) de matière grasse de fromages fabriqués dans les conditions indiquées dans la légende de la figure 5.

Le tableau II montre que l'on retrouve une quantité de β carotène généralement inférieure à celle prévue par le calcul ; on utilise pour ce calcul, la quantité de β carotène dosée dans la matière grasse du fromage fabriqué à partir de lait de vache pur. La différence peut atteindre 10 p. 100.

La fidélité de la méthode est donc moins bonne dans le cas des fromages que dans le cas du beurre. En fait, les causes d'erreur dans le cas des fromages sont aussi plus nombreuses. Alors que pour le beurre on constitue les mélanges de matière grasse de chèvre et de vache par pesée

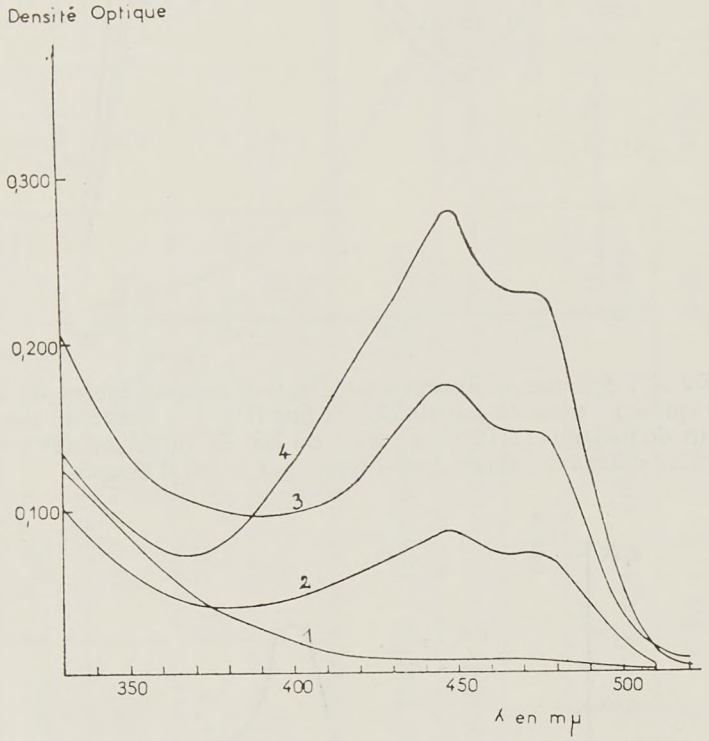


FIG. 7. — *Expérience C* : Spectres d'absorption d'éluats d'insaponifiables (repris par 10 ml d'hexane) de la matière grasse de fromages fabriqués dans les conditions indiquées dans la légende de la figure 5.
L'insaponifiable est extrait après attaque alcaline.

d'une quantité convenable de chacune de ces matières grasses, ces proportions sont établies, pour les fromages, par un mélange de lait de chacune des espèces. Il n'est pas impossible que suivant les conditions du moulage, de l'égouttage, etc. une modification des proportions relatives des deux matières grasses intervienne dans le fromage final.

De plus la quantité de matière grasse extraite par la méthode de SOXHLET est généralement inférieure à celle que l'on obtiendrait en pratiquant sur le même échantillon l'extraction de la matière grasse après attaque acide (procédé S. B. R. par exemple) du fromage ; mais on ne peut employer cette dernière méthode car nous avons vérifié que l'attaque acide détruit complètement le β carotène.

Dans les analyses qui ont été rapportées ci-dessus, le maximum d'ab-

sorption du composé élué par la solution d'hexane contenant 0,75 p. 100 (v/v) d'acétone se place souvent vers 448 mμ. Cet écart avec la valeur trouvée par le β carotène pur (450 mμ) peut provenir d'une part d'une petite quantité d'α carotène élué en même temps que le β carotène et dont le maximum d'absorption se place à 445 mμ en solution dans l'hexane (10 *a*) et d'autre part de l'existence de dérivés d'oxydation du β carotène formés au cours des opérations préliminaires d'extraction de l'insaponifiable ; ces composés, en solution dans l'hexane présentent un maximum d'absorption à une longueur d'onde légèrement inférieure (446 mμ) (10 *b*).

V. — DISCUSSION ET CONCLUSION

Ni la méthode que nous proposons, ni d'ailleurs la méthode de CHOLLET et CAMUS (1) ne sont applicables à la recherche d'une fraude qui s'exercerait sur le lait écrémé. D'autre part, comme on l'observe pour tous les constituants du lait et en particulier pour l'acidité volatile soluble et insoluble de la matière grasse du lait (11, 12, 13) la teneur moyenne du lait de vache en β carotène peut varier suivant la race des vaches laitières, le stade de lactation, la nature des pâturages, le mode de vie et d'alimentation du cheptel bovin. Les variations saisonnières du contenu en carotène du lait de vache ont été étudiées dans différents pays (14, 15, 16). En France, cette étude a été limitée à la région parisienne (8). Mais il est toujours possible de connaître, à une époque déterminée et dans une région déterminée, le contenu en β carotène d'un lait de vache de mélange utilisé comme lait de référence. Il est également facile d'analyser en même temps qu'un fromage de chèvre, un fromage fabriqué avec du lait de vache, dans la même région et à la même époque que le fromage de chèvre suspecté.

L'intérêt essentiel de la méthode proposée et l'avantage qu'elle présente par rapport à la méthode de CHOLLET et CAMUS (1) réside dans le fait que la comparaison porte, non pas, comme dans le cas des acides volatils, sur des composés dont les proportions relatives seules sont différentes dans le lait de vache et dans le lait de chèvre, mais sur un corps, le β carotène, présent dans le lait de vache et complètement absent dans le lait de chèvre.

Reçu pour publication le 27 janvier 1959.

Nous remercions Mlle M. PERSONAGE, Stagiaire à la Station centrale de Recherches Laitières, de l'aide qu'elle nous a apportée au début de cette étude.

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

(1) CHOLLET (A.) et CAMUS (A.). — Etude de la matière grasse du lait de chèvre, son application éventuelle à la recherche du mélange : lait de chèvre et lait de vache. *Le lait*, **17**, 135, 1937.
(2) LOPEZ (R. C.). — Différenciation des laits de chèvre et de vache. *Le lait*, **16**, 1122-1936.
(3) HADLAND (G.) et SOLBERG (P.). — Serological detection of cows milk added to goat's milk. *Meld. Norg. Landbr. Hogsk. Meieri. Adv.*, **29**, 1952 et *Dairy Science Abstracts*, **15**, 74, 1953.
(4) CHANDA (R.). — Carotene in goat liver and colostrum. *Biochem. J.*, **51** (1), IV, 1952.
(5) DEARDEN (D. V.), HENRY (K. M.), HOUSTON (J.), KON (S. K.). — A study of the balance of certain milk nutrients in the making of Cheddar, Cheshire and Stilton cheese, and of their fat during the ripening of the cheese. *J. Dairy. Res.*, **14**, 100, 1945.
(6) DEUEL (H. J.). — The lipids. Interscience publishers Ltd. London, 1955, vol. 1, p. 661.
(7) THOMPSON (S. Y.) et KON (S. K.). — Some application of chromatography in the work of the National Institute for Research in Dairying. *VIII*e *Cong. Intern. Ind. Agric.*, Bruxelles, 1950, **11**, 55.
(8) FRANCOIS (A.). — Recherche sur le comportement biochimique et physiologique de la vitamine A dans la sécrétion lactée. Thèse Fac. Sci., Univ. de Paris, 1948.
(9) LEMELAND (P.). — Recherches sur le dosage des lipoïdes dans le sang et les tissus. *Bull. Soc. Chim. Biol.*, **5**, 110, 1923.
(10) KARRER (P.) et JUCKER (E.). — Carotenoids. Elsevier publishing Company, Inc. New-York, 10*a*, p. 154, 10*b*, p. 138.
(11) KUZDZAL-SAVOIE (S.). — Influence du stade de lactation sur les caractéristiques de la matière grasse du beurre. Ann. l'INRA Série E, Techno. p. 1, 1956.
(12) KUZDZAL-SAVOIE — Etude de l'influence de la race des vaches laitières sur la composition de la matière grasse du lait et la qualité du beurre. Expérimentation conduite à Echiré. Ann. INRA, Série E, Techno (sous presse).
(13) KUZDZAL-SAVOIE (S.). — Les limites de variations des indices de la matière grasse du beurre. *Ann. Fals. Fraudes*, n° 575, 452, 1956.
(14) MCDOWELL (A. K. R.) et MCDOWALL (F. H.). — The vitamine A potency of New-Zealand butter. *J. Dairy Res.*, **20**, 76, 1953.
(15) SCHWARZ (G.), LUDWIG (J.) et GIESSLER (E. M.). — Eigenschaften und Zusammensetzung von Kuhmilch in Baden-Wurtemberg. *Milchwirts. Forsch. Kiel*, **3**, 1957.
(16) KRUISHEER (C. I.) et DEN HERDER (P. C.). — The vitamin A and caroten contents of dutch butter. *Neth. Milk and Dairy J.*, **6**, 109, 1952.

RECHERCHES SUR L'ACTION FONGICIDE DE LA MYCOSTATINE

PAR

FLANZY (M.) et BENARD (P.)

Station centrale de Technologie des produits végétaux, Narbonne.

En œnologie, le problème de la vinification et de la conservation des Vins Doux est un des plus délicats à résoudre. Pendant longtemps, on a eu recours à l'anhydride sulfureux sous ses différentes formes. Mais les abus qui ont été commis, les emplois intempestifs qui en ont été faits, ont provoqué une vive réaction, non seulement pour sa limitation à des doses raisonnables, mais aussi pour son élimination et son remplacement.

Parmi les corps de remplacement envisagés, les antibiotiques tiennent une place de choix. Déjà de nombreux travaux ont indiqué les avantages respectifs d'un grand nombre d'entre eux (1-2). Il apparaît, sans conteste, que les antibiotiques susceptibles d'être retenus sont rares. La mycostatine serait un de ceux-là.

C'est avec ce produit que des essais ont été entrepris à la Station aux vendanges de 1957 et 1958. Ce mémoire en est la relation.

Caractéristiques de la mycostatine.

La mycostatine est isolée de cultures de *Streptomyces noursei*. Elle est encore dénommée nystatine et fungicidine. Elle se présente sous forme d'une poudre micro-cristalline jaune pâle, paraissant plus foncée avec le temps. Elle est inodore et possède une saveur amère.

Elle répond à la formule brute $C_{46}\ H_{83}\ NO_{18}$ d'après une note technique des établissemens Pechiney-Progil, et $C_{46}\ H_{77}\ NO_{19}$ d'après certains expérimentateurs (1).

Sa formule développée n'est pas exactement connue. On sait que la mycostatine fixe 12 atomes de H, en fonction de 6 doubles liaisons existant dans sa chaîne carbonée. Elle possède par ailleurs une fonction acide et une fonction basique. Sa suspension aqueuse, à la dose de 3 p. 100, a un pH compris entre 7,5 et 8,0.

On a bien dit suspension. En effet, la mycostatine est insoluble dans l'eau, et légèrement soluble dans l'alcool dilué. Ces propriétés devront être constamment présentes à l'esprit quand il s'agira d'interpréter les résultats obtenus.

On ne possède pas encore de méthode chimique de dosage de la mycostatine, pour la raison bien simple que sa structure moléculaire n'est pas entièrement connue. On fait appel aux méthodes biologiques pour le titrage et le contrôle du produit. Et c'est ainsi que l'on a établi une unité biologique de base. C'est par millilitre de milieu de culture la quantité de mycostatine nécessaire et suffisante pour inhiber le développement de *Saccharomyces cerevisiae* dans un milieu approprié.

Le titre des préparations commerciales varie normalement entre 2 500 000 et 3 500 000 Unités biologiques par gramme, soit 2 500 à 3 500 par milligramme.

Enfin, il est important de noter qu'en présence d'eau la mycostatine devient rapidement inactive.

Le produit utilisé dans notre expérimentation porte les caractéristiques suivantes :

W 57 m — Titre 3 500 U/mmg.

Remarquons en passant qu'il faut traduire « milligramme » et non « millimètre-gramme ».

Deux séries d'essais auront pour objet, d'une part de déterminer la valeur fongistatique de la mycostatine, d'autre part sa valeur fongicide. Des résultats obtenus, on verra s'il est possible de l'utiliser, soit pour la conservation des Jus de Raisin, soit pour la vinification des Vins Blancs Doux.

Rappelons que sous le nom d'effet fongistatique on désigne l'inhibition de la croissance des levures et de la fermentation alcoolique dans un milieu récemment ensemencé, et sous le nom d'effet fongicide l'arrêt de la fermentation alcoolique spontanée ou provoquée.

Recherches sur la valeur fongistatique de la mycostatine.

Le 16 novembre 1957 on foule un mélange de raisins Servant et Gros Vert atteints de pourriture grise (*Botrytis cinerea*). Le moût de goutte obtenu est très bourbeux. Sa densité est de 1 095, ce qui correspond à 13°1 d'alcool en puissance. On pressure le marc restant. Le moût de presse est mélangé au moût de coule. Ce mélange, bien homogénéisé, est distribué, à raison de 750 millilitres par bouteille, dans une série de bouteilles de 1 litre. On ajoute aussitôt des doses de mycostatine variant de 14 000 U/litre à 63 000 U/litre. La mycostatine est utilisée en suspension dans l'eau à raison de 1 gramme de produit dans 1 litre d'eau. 1 millilitre de cette

suspension contient donc, dans l'hypothèse d'une homogénéité parfaite, 1 milligramme de mycostatine, c'est-à-dire avec la mycostatine utilisée 3 500 Unités.

La répartition des échantillons est la suivante :

n° 1 Témoin
n° 2 Moût + 14 000 U /litre, soit 4 ml de suspension par litre
n° 3 Moût + 21 000 U /litre, soit 6 ml de suspension par litre
n° 4 Moût + 28 000 U /litre, soit 8 ml de suspension par litre
n° 5 Moût + 35 000 U /litre, soit 10 ml de suspension par litre
n° 6 Moût + 42 000 U /litre, soit 12 ml de suspension par litre
n° 7 Moût + 49 000 U /litre, soit 14 ml de suspension par litre
n° 8 Moût + 56 000 U /litre, soit 16 ml de suspension par litre
n° 9 Moût + 63 000 U /litre, soit 18 ml de suspension par litre.

4 heures après le traitement, tous les échantillons, sauf le témoin, sont limpides.

Le 18 novembre, soit 36 heures après, le témoin et l'échantillon n° 2 fermentent. Les autres échantillons sont encore limpides. Une numération des levures donne les résultats suivants par ml : 20 millions dans le témoin, 4 millions pour le n° 2, 100 000 pour les échantillons n° 3 et 4, et respectivement 120 000 pour le n° 5, 130 000 pour les n° 6 et 7, 90 000 pour le n° 8, 30 000 pour le n° 9. Cette numération confirme bien la non-fermentation des échantillons n° 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9.

Un effet fongistatique est nettement obtenu à partir du n° 3. Dans ces conditions expérimentales, la dose de 14 000 Unités est insuffisante ; au contraire, celle de 21 000 est suffisante.

A ce moment on prélève de chaque échantillon 300 millilitres de moût (limpides pour tous les essais sauf pour les n° 1 et 2, marqués toutefois par le dépôt normal de grosses bourbes). Ces 300 ml sont mis dans des flacons de 375 ml, bouchés ensuite par un tampon d'ouate. Cette série de 300 ml servira à étudier l'effet fongicide de la mycostatine, ainsi qu'on le verra plus loin. Elle est numérotée 11 - 12 - 13 - 14 - 15 - 16 - 17 - 18 - 19.

La partie restante est laissée dans les flacons d'origine de 1 litre. Ceux-ci sont placés à l'étuve à 28°C, le 19 novembre. Cette série conserve le numérotage initial.

2 jours après, la fermentation a repris dans tous les échantillons, mais d'autant plus rapidement que la dose de mycostatine est plus faible. Le 23 novembre, les fermentations paraissent achevées dans tous les échantillons.

On peut donc conclure que dans ces conditions expérimentales l'effet fongistatique de la mycostatine a été finalement nul. Mais il faut retenir qu'avec une quantité suffisante un réel effet fongistatique est réalisé pendant 2 à 3 jours. Cette période est suffisante pour réaliser un débourbage, opération fondamentale en vinification des vins blancs. Certes, le débour-

bage est plus ou moins discuté, mais il est obligatoire chaque fois que les raisins sont plus ou moins souillés de matières étrangères.

Ici donc la mycostatine peut fort bien être substituée à l'anhydride

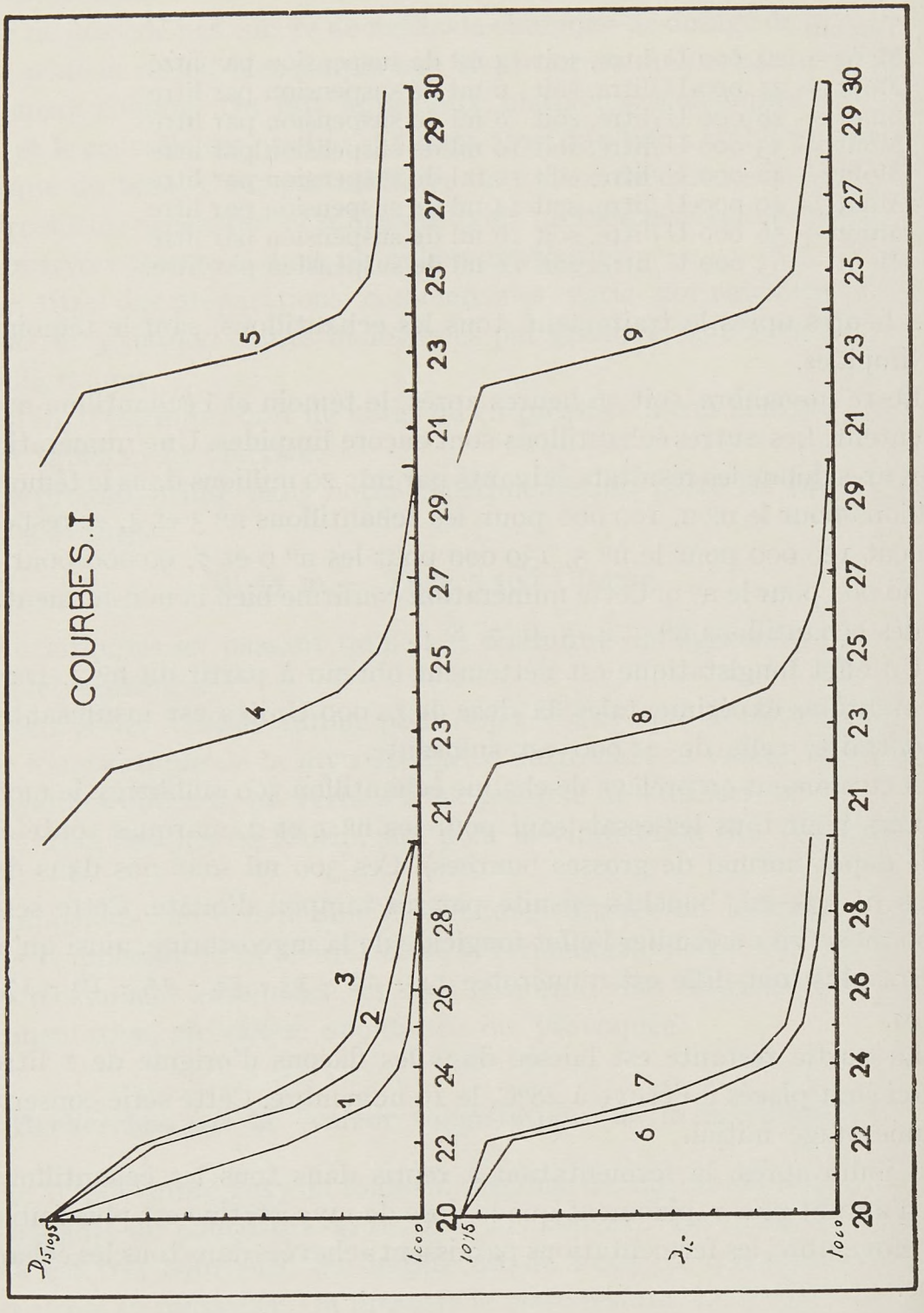


Fig. 1.

sulfureux comme agent débourbant, si par ailleurs cet emploi n'offre pas de graves défauts de nature physiologique.

L'essai a été répété sur le même moût, mais sur un volume de 4 litres et non plus de 750 ml le 20 novembre 1957.

Dans un essai, on ajoute 24 500 U/litre, soit 7 ml de suspension de mycostatine par litre, dans un second 70 000 U/litre, soit 20 ml de suspension de mycostatine par litre.

Ces deux moûts se clarifient rapidement. Ils sont laissés sur leurs bourbes. Leur surface se recouvre d'un épais voile de moisissures.

Pendant toute la période expérimentale les échantillons sont gardés à la température du laboratoire (15°-20°C).

L'échantillon qui a reçu 24 500 U/litre commence à fermenter le 12 décembre, le second échantillon le 13 janvier seulement.

Les fermentations se poursuivent jusqu'à leur fin normale.

Ici encore l'effet fongistatique, très net au début, n'a été que provisoire. Comme dans l'essai précédent, il donne le temps de procéder aux opérations de débourbage, quand elles se révèlent utiles.

Ces essais ont été repris aux vendanges 1958, en mettant en comparaison l'effet fongistatique éventuel de la mycostatine avec la pasteurisation des jus, réalisée dans un cas après embouteillage, dans l'autre avant embouteillage à chaud.

Les essais ont porté sur du moût de S. V. 12.375.

L'essai mycostatine comprenait 4 flacons ayant reçu respectivement :

n° 1 : 21 000 U/litre
n° 2 : 42 000 U/litre
n° 3 : 63 000 U/litre
n° 4 : 84 000 U/litre

L'essai de pasteurisation en bouteilles était réalisé à 70°C pendant 20 minutes.

L'essai de pasteurisation avant embouteillage était réalisé de la façon suivante :

Le jus était porté à la température de 80°C aussi rapidement que possible (2 minutes), embouteillé et capsulé aussitôt. Les bouteilles étaient abandonnées au refroidissement au laboratoire même.

Les jus de la série « *essais mycostatine* » se sont aussitôt clarifiés. On soutire le jus clair en trois périodes :

— une première partie aussitôt après clarification ; le jus est ensuite embouteillé dans des bouteilles stérilisées dans l'eau à 100°C (4 bouteilles) ;

— une deuxième partie 24 heures après clarification ; le jus est embouteillé dans les mêmes conditions que ci-dessus (4 bouteilles) ;

— une troisième partie 48 heures après clarification ; le jus est également embouteillé dans les mêmes conditions (4 bouteilles).

13 jours après, tous les échantillons provenant du n° 1 fermentent, quelle que soit l'époque de l'embouteillage. Pour les échantillons en provenance des n° 2 et 3, seuls ne fermentent pas ceux embouteillés aussitôt après clarification. Pour les échantillons en provenance du n° 4, seuls les échantillons embouteillés 48 heures après clarification fermentent.

2 mois après, tous les échantillons des essais 1, 2 et 3 ont fermenté. Pour l'essai 4, seules ne fermentent pas encore 2 bouteilles sur 4 dans l'embouteillage réalisé 24 heures après clarification, et 3 bouteilles sur 4 dans l'embouteillage immédiat.

Il est bien caractéristique de noter la variation des effets entre les trois périodes. Elle confirme l'atténuation des propriétés fongiques de la mycostatine.

Mais de toutes façons, l'effet fongistatique n'a été que provisoire.

Il est donc impossible d'envisager sur ces données une technique de stockage du Jus de Raisin. On retiendra seulement une possibilité appréciable de débourbage.

Par contre, aucun échantillon de la série « *essais pasteurisation* » n'avait subi le moindre début de fermentation deux mois après le commencement de l'expérimentation.

Recherches sur la valeur fongicide de la mycostatine.

Tous les échantillons constitués par le prélèvement de jus de 300 ml reçoivent 2 p. 100 d'un levain de *Saccharomyces Ellipsoidus* contenant 140 millions de levures au ml. Les échantillons sont alors placés à l'étuve à 28°C, le 18 novembre.

Le 20 novembre, tous les échantillons sont en pleine fermentation, en particulier le n° 12 a une densité de 1 044. Le comptage des levures nous donne par ml : Témoin (11) : 112 millions; n° 12: 102 millions; n° 13 : 93 millions ; n° 14 : 90 millions ; n° 15 : 89 millions ; n° 16 : 81 millions ; n° 17 : 94 millions ; n° 18 : 96 millions ; n° 19 : 82 millions.

On constate sans discussion que l'addition de mycostatine opérée le 17 est sans effet sur la multiplication cellulaire et la fermentation alcoolique ; celle-ci est suivie par pesée des flacons.

Les échantillons impairs sont abandonnés à eux-mêmes.

Les échantillons pairs reçoivent des doses croissantes de mycostatine.

n° 12 : 36 000 U/l, soit 3 ml de suspension pour 300 de moût.

n° 14 : 52 000 U/l, soit 4,5 ml de suspension pour 300 de moût.

n° 16 : 70 000 U/l, soit 6 ml de suspension pour 300 de moût.

n° 18 : 105 000 U/l, soit 9 ml de suspension pour 300 de moût.

Les échantillons ont donc finalement reçu une dose complémentaire de mycostatine.

Le 21, la fermentation continue dans l'échantillon n° 12 (107 millions de levures). Mais elle est stoppée dans les échantillons 14, 16, 18 (18 millions de levures).

Quelques jours après, l'échantillon n° 12 atteint la densité 1 000. Pratiquement, la fermentation y est terminée. Mais 10 jours après, elle n'a toujours pas repris dans les échantillons 14, 16, 18.

Cet arrêt se maintient un mois, puis deux. Un an après, les échantillons

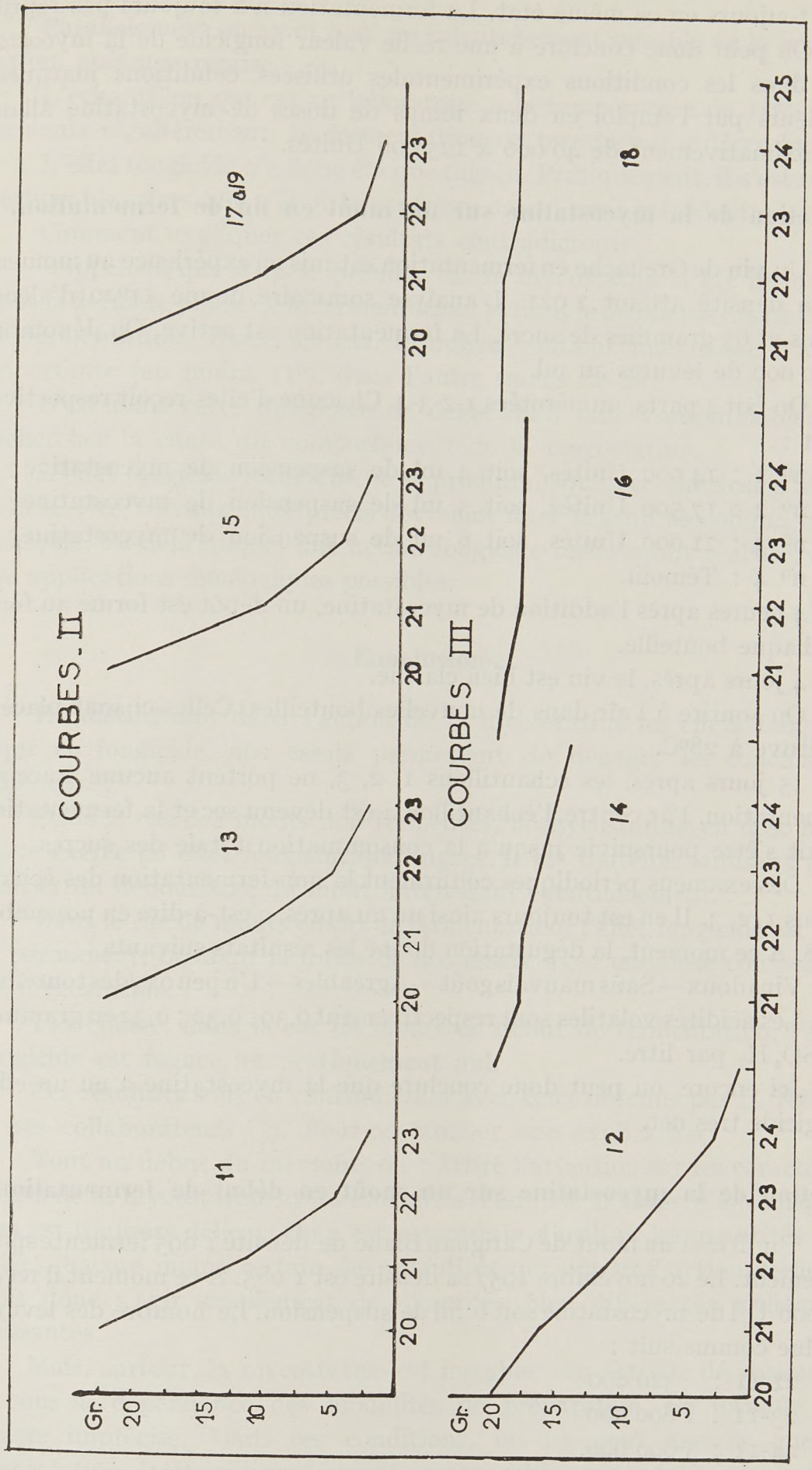

COURBES. II
COURBES III
Gr.
20
15
10
5
11
13
15
17 & 19
12
14
16
18
20 21 22 23 24 25

FIG. 2.

sont toujours en ce même état. La fermentation n'a toujours pas repris.

On peut donc conclure à une réelle valeur fongicide de la mycostatine, dans les conditions expérimentales utilisées, conditions marquées d'ailleurs par l'emploi en deux temps de doses de mycostatine allant approximativement de 40 000 à 125 000 Unités.

Action de la mycostatine sur un moût en fin de fermentation.

Un vin de Grenache en fermentation est mis en expérience au moment où sa densité atteint 1 021. L'analyse sommaire donne 11°20 d'alcool acquis et 63 grammes de sucre. La fermentation est active. On dénombre 8 000 000 de levures au ml.

On fait 4 parts, numérotées 1-2-3-4. Chacune d'elles reçoit respectivement :

n° 1 : 14 000 Unités, soit 4 ml de suspension de mycostatine ;
n° 2 : 17 500 Unités, soit 5 ml de suspension de mycostatine ;
n° 3 : 21 000 Unités, soit 6 ml de suspension de mycostatine ;
n° 4 : Témoin.

4 heures après l'addition de mycostatine, un dépôt est formé au fond de chaque bouteille.

4 jours après, le vin est bien clarifié.

On soutire à l'air dans de nouvelles bouteilles. Celles-ci sont placées à l'étuve à 28°C.

15 jours après, les échantillons 1, 2, 3, ne portent aucune trace de fermentation. Par contre, l'échantillon 4 est devenu sec et la fermentation paraît s'être poursuivie jusqu'à la consommation totale des sucres.

Des examens périodiques confirment la non-fermentation des échantillons 1, 2, 3. Il en est toujours ainsi un an après, c'est-à-dire en novembre 1958. A ce moment, la dégustation donne les résultats suivants :

Vins doux — Sans mauvais goût — Agréables — Un peu oxydés toutefois.

Les acidités volatiles sont respectivement 0,39 ; 0,32 ; 0,32 en grammes de SO_4H_2 par litre.

Ici encore, on peut donc conclure que la mycostatine a eu un effet fongicide très net.

Action de la mycostatine sur un moût en début de fermentation.

Un litre d'un moût de Carignan Blanc de densité 1 095 fermente spontanément. Le 20 novembre 1957 sa densité est 1 085. A ce moment il reçoit 21 000 U/l de mycostatine soit 6 ml de suspension. Le nombre des levures évolue comme suit :

21-11 : 320 000
23-11 : 1 800 000
24-11 : 5 000 000.

Parallèlement on avait noté un ralentissement sensible de la fermentation, puis une reprise.

L'échantillon qui est au laboratoire à la température de 15° - 18°C fermente régulièrement. La fermentation est terminée le 4 décembre.

L'effet fongicide n'a donc été que fugace. Pratiquement, il s'est révélé négligeable, alors que c'était le contraire dans l'essai précédent.

Comment expliquer ces résultats contradictoires?

Rappelons que dans le premier cas la mycostatine a été introduite dans la dernière phase de la fermentation, et dans le deuxième cas en début de fermentation. Dans un cas, le milieu contient une masse d'alcool importante (au moins 11°), dans l'autre moins de 2°.

C'est dans cette différence de degré qu'il faut vraisemblablement rechercher la cause du comportement de la mycostatine.

L'effet fongicide recherché ne se produirait qu'avec une dose d'alcool définie. Des travaux plus précis devraient fixer le seuil alcoolique indispensable, au-delà duquel une action fongicide réelle serait réalisée, avec des applications œnologiques possibles.

Conclusions.

En distinguant dans l'action de la mycostatine les effets fongistatique et fongicide, nos essais permettent de dégager les conclusions suivantes :

Dans le cas des moûts non fermentés, la mycostatine en dose suffisante exerce un effet fongistatique fugace. Il est toutefois suffisant pour réaliser un débourbage du moût, intéressant éventuellement.

Dans le cas de moûts en fin de fermentation, l'effet fongicide est net, et permanent, pendant la durée de nos essais, avec une dose convenable de mycostatine.

Par contre, dans le cas de moûts en début de fermentation, l'effet fongicide est fugace, et pratiquement nul.

Ces résultats sont en contradiction avec ceux obtenus par E. NÈGRE et ses collaborateurs (3). Peut-on trouver une explication?

Tout au début du mémoire, on a attiré l'attention sur les caractéristiques de la mycostatine et les modalités d'emploi. L'usage d'une suspension est toujours délicat. On n'est pas certain d'utiliser les quantités calculées, encore moins certain des quantités qui ont une action réelle. Il peut donc s'agir simplement de quantités bien différentes réellement agissantes.

Mais, surtout, la mycostatine est instable, son activité décroissante, et sous la dépendance des modalités de préparation. Sa formule est encore imprécise. Dans ces conditions, on ne peut assurer que la mycostatine était rigoureusement comparable dans tous ces essais.

Signalons enfin que les raisins utilisés dans les essais étaient botrytisés. Leur fermentescibilité était peut-être naturellement moins grande que dans le cas de raisins sains.

Par contre, nos résultats confirment ceux trouvés par RIBÉREAU et ses collaborateurs.

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

(1) PEYNAUD (E.), LAFOURCADE (S.) et LAFON (M.). — Action de nouveaux antibiotiques antifongiques sur les levures de vins. *C. R. Ac. Sc*, **244**, 2426-2429 ; 1954.

(2) RIBÉREAU-GAYON (J.), PEYNAUD (E.), LAFOURCADE (S.) et LAFON (M.). — Mode d'action des antibiotiques antifongiques sur les levures. *Bull. Soc. Chim. Bio.*, XL, n° 1, 189-201 ; 1958.

(3) NÈGRE (E.), GALZY (P.). — Recherches sur l'action fongicide de la mycostatine (non publié).

ÉTUDE DES CONDITIONS D'EMPLOI DE LA MÉTHODE SMEETS POUR LE DOSAGE DU CALCIUM IONISÉ DANS UN ULTRAFILTRAT DE LAIT

PAR

M. SAINCLIVIER

Laboratoire de recherches de Technologie laitière,
Centre de Recherches Agronomiques de l'Ouest,
École Nationale d'Agriculture, Rennes.

PLAN DU MÉMOIRE

Introduction.

Principe de la méthode.

Vérification de certains points de la méthode.

Étude des différents facteurs susceptibles d'influer sur la coloration :
l'âge de la solution d'indicateur,
la dose d'indicateur,
la nature de l'indicateur,
la durée de coloration,
la température à laquelle sont conservés les échantillons pendant la coloration,
la lumière.

Essai de mesure à l'électrophotomètre.

Différents types d'appareils essayés.
Protocole des essais.
Résultats.

Influence éventuelle du développement microbien sur la teneur en calcium ionisé.

Résumé.

INTRODUCTION

La stabilité du lait dépend, parmi d'autres facteurs, de sa teneur en calcium ionisé. Depuis longtemps, des sels de calcium (généralement $CaCl^2$) sont ajoutés au lait pour faciliter la coagulation par la présure-

Dans certains cas d'instabilité (anomalie d'Utrecht) qui ne sont pas imputables à l'acidification par la flore microbienne, une teneur accrue en calcium ionisé a été observée dans l'ultrafiltrat du lait (Smeets (1)). Différentes méthodes ont été essayées pour le dosage du calcium ionisé (1, 2, 3). A l'occasion d'une étude sur la relation entre la durée de conservation du lait et sa teneur en calcium ionisé, nous avons précisé les conditions d'emploi de la méthode utilisée par Seekles et Smeets (4).

PRINCIPE DE LA MÈTHODE

Les auteurs dosent le calcium dans l'ultrafiltrat du lait. Le dosage est basé sur le changement de couleur d'un indicateur (murexide ou purpurate de potassium) ajouté en quantité connue à la solution de calcium à doser. La mesure de la coloration permet la détermination de la concentration en ions Ca^{++} du lait par comparaison avec des solutions de titre en calcium ionisé connu.

Solutions étalons

On prépare des solutions étalons de pH 6,5 et de force ionique 0,08 (force ionique des ultrafiltrats de laits). Ces solutions contiennent : soit un excès de calcium (solution à 0,2 M/l de calcium ionisé par litre), soit une quantité de calcium ionisé comparable à celle de l'ultrafiltrat du lait (par exemple solution à 3 mM/l de calcium ionisé), soit pas de calcium ionisé (tableau I).

Tableau I

Composition des solutions étalons (d'après Smeets, 1 et 4).

Désignation des solutions étalons	Solution de $CaCl_2$		Solution dite « Oslo » (1)	Solution tampon pH 6,49	Eau distillée
	à 0,01 M/l	à 1 M/l			
	volume en ml	volume en ml	volume en ml	volume en ml	volume en ml
E_1	0	0	10,00	10,00	q. s. p. 100 ml
E_{a1}	10	0	9,62	10	—
E_{a2}	20	0	9,25	10	—
E_{a3}	30	0	8,86	10	—
E_{a4}	40	0	8,48	10	—
E_{a5}	50	0	8,10	10	—
E_{a6}	60	0	7,72	10	—
E_{a7}	70	0	7,34	10	—
E_{a8}	80	0	6,96	10	—
E_2	0	20	0	10	—

(1) La composition de la solution « Oslo » est la suivante (par litre) :
0,20 M de NaCl
0,45 M de KCl
0,05 M de $MgCl_2$

Indicateur

C'est une solution aqueuse de murexide ou de purpurate de potassium à environ 0,1 g p. 100 ml. SMEETS signale qu'il n'est pas nécessaire de préparer une solution d'indicateur de concentration rigoureusement déterminée puisque la méthode n'utilise que des valeurs relatives.

Mode opératoire

On ajoute à 10 ml de chacune des solutions étalons, la même quantité d'indicateur, par exemple 0,1 ml. Après mélange, les solutions sont

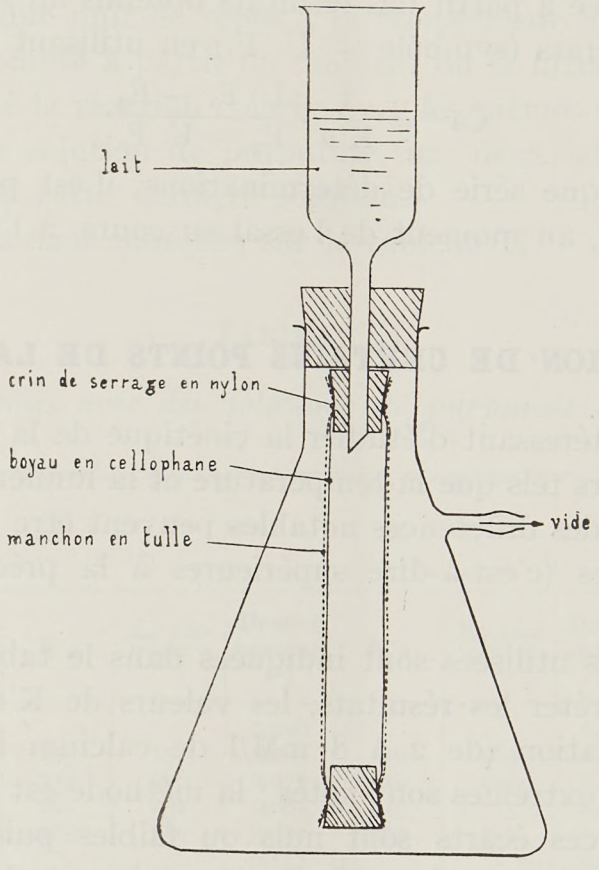


Fig. 1. — Dispositif pour ultrafiltration de lait.

examinées au spectrophotomètre Beckman DU à la longueur d'onde de 480 mμ. On opère ensuite de la même manière avec les ultrafiltrats de lait, ceux-ci sont préparés en versant le lait dans un boudin de cellophane (1) de 12 mm de diamètre et 10 cm de longueur selon une technique analogue à celle décrite par SMEETS au moyen d'un dispositif représenté sur la figure 1. Un séjour d'une nuit à la glacière (0° à + 5°C) permet de recueillir de 10 à 20 ml d'ultrafiltrat.

(1) Visking tubing.

Calculs

La « constante d'association » K'a (valeur réciproque de la constante de dissociation) du complexe (Ca-purpurate) est tout d'abord déterminée à l'aide des résultats obtenus au spectrophotomètre pour les solutions étalons E_1, E_a, et E_2. On utilise la formule :

$$K'a = \frac{1}{Ca^{++}} \cdot \frac{E_a - E_1}{E_2 - E_a}.$$

(Ca^{++} étant la concentration en M/l de calcium ionisé de la solution E_a) E_1, E_a, E_2 = résultats obtenus au spectrophotomètre pour les solutions E_1, E_a, E_2.

La valeur de K'a étant connue, la concentration en Ca^{++} des ultrafiltrats est calculée à partir des résultats obtenus au spectrophotomètre pour ces ultrafiltrats (symbole = U. F.) en utilisant la formule :

$$Ca^{++} = \frac{1}{K'a} \cdot \frac{U.\,F. - E_1}{E_2 - U.\,F.}.$$

Lors de chaque série de déterminations, il est préférable d'établir la valeur de K'a, au moment de l'essai en cours, à l'aide des solutions étalons.

VÉRIFICATION DE CERTAINS POINTS DE LA MÉTHODE

Il a paru intéressant d'étudier la cinétique de la coloration et l'influence de facteurs tels que la température et la lumière ou, plus exactement, de voir si des différences notables peuvent être décelées et si elles sont significatives (c'est-à-dire supérieures à la précision connue des appareils).

Les solutions utilisées sont indiquées dans le tableau I.

Pour interpréter les résultats, les valeurs de K'a sont calculées à chaque concentration (de 2 à 8 mM/l de calcium ionisé) ; les écarts entre les valeurs extrêmes sont notés ; la méthode est considérée comme valable lorsque ces écarts sont nuls ou faibles puisque la constante d'association K'a du complexe (Ca-Purpurate) peut alors être considérée comme sensiblement la même, quelle que soit la concentration en calcium ionisé, à condition de rester dans les limites de 2 à 8 mM/l.

Les lectures effectuées au spectrophotomètre sur les diverses solutions (E_a) sont aussi exprimées, comme l'avait fait SMEETS, en p. 100 de la valeur du témoin sans calcium (E_1). Pour chaque concentration, on calcule le rapport :

$$\frac{E_a \times 100}{E_1} \text{ (densité optique relative).}$$

Dans cette formule, E_a et E_1 sont les densités optiques lues au spectrophotomètre pour les solutions E_a et E_1.

Pour chaque série d'essais, on porte, sur un graphique, les densités optiques correspondant aux solutions de concentrations 2, 4, 6 et 8 mM/l de calcium ionisé. Le résultat est jugé d'autant meilleur que les points sont mieux alignés sur une droite et que le coefficient angulaire de cette droite est plus élevé.

Étude de différents facteurs susceptibles d'influer sur la coloration

Influence de l'âge de la solution d'indicateur

Le purpurate de potassium (ou le murexide) est dissous à chaud (40°C) dans la proportion de 100 mg p. 100 ml d'eau distillée. La solution est filtrée après une nuit de repos à la température ambiante ; l'âge de la solution est compté à partir du moment où la filtration est terminée.

On a effectué la réaction colorée avec les mêmes solutions standard et avec la même solution de purpurate, un, deux, et trois jours après la préparation de cette dernière solution.

Les résultats sont indiqués sur le tableau II.

TABLEAU II

Résultats obtenus avec des solutions de purpurate d'âge différent.

Age de la solution (en heures)	24			48			72		
Désignation des solutions étalons	Densité optique (1)	K'a	$\frac{E_a \cdot 100}{E_1}$	Densité optique (1)	K'a	$\frac{E_a \cdot 100}{E_1}$	Densité optique (1)	K'a	$\frac{E_a \cdot 100}{E_1}$
E_1	0,038			0,040			0,040		
$E_a 2$	0,065	245	171	0,065	240	163	0,055	150	137
$E_a 4$	0,078	238	206	0,076	220	190	0,070	215	175
$E_a 6$	0,088	261	232	0,085	235	213	0,075	195	188
$E_a 8$	0,095	285	250	0,092	260	230	0,085	280	212
E_2	0,120			0,117			0,105		
Valeur moy. de K'a ...		257			239			210	
Écart entre les valeurs extrêmes de K'a		47			40			130	

(1) Précision de la lecture de la densité optique : ± 0,002.

On voit qu'à partir du 3e jour (colorant âgé de 72 h), la valeur moyenne de K'a diminue et que l'écart entre les valeurs extrêmes de K'a devient plus élevé.

Sur la figure 2, on a tracé les courbes indiquant les variations de la densité optique relative en fonction de la concentration en calcium ionisé pour des colorants d'âge différent. Avec un colorant âgé de deux jours, la courbe est déjà plus infléchie aux concentrations élevées ; l'alignement des points est encore moins bon si le colorant employé est préparé depuis trois jours. Avec un colorant âgé de huit jours, on n'observe plus aucune relation entre la concentration en calcium ionisé et les valeurs de la densité optique.

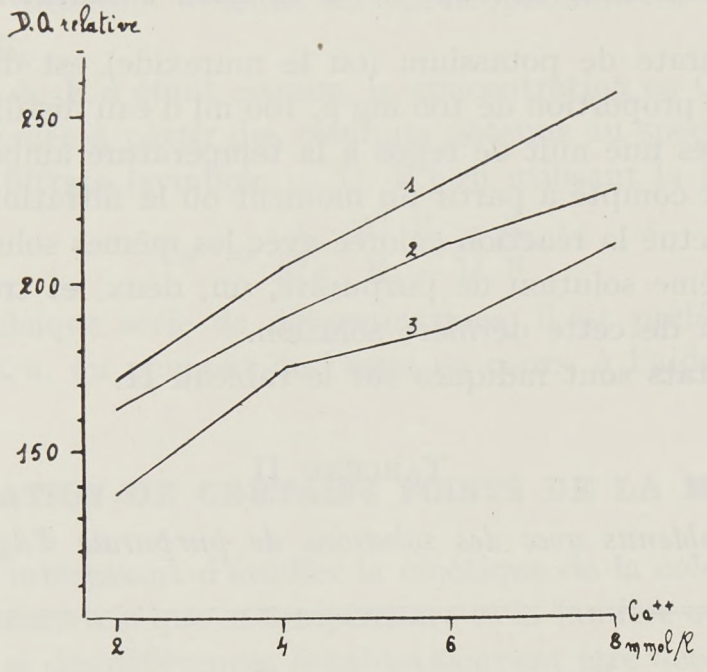


FIG. 2. — Valeurs des densités optiques relatives, aux diverses concentrations en Ca^{++} selon l'âge de la solution de purpurate de potassium. — D. O. : Densités optiques relatives. — Ca^{++} : Concentrations en mM/l de Ca^{++}. — Courbe 1 : colorant préparé depuis 1 jour. — Courbe 2 : colorant préparé depuis 2 jours. — Courbe 3 : colorant préparé depuis 3 jours.

SMEETS avait déjà signalé cette instabilité du colorant. Nos propres résultats conduisent à limiter l'emploi d'une solution de purpurate à 0,1 g p. 100 aux 24 heures qui suivent sa préparation.

Influence de la dose d'indicateur

Les solutions étalons sont additionnées :

— soit d'un même volume des solutions d'indicateur de concentration croissante,

— soit de volumes croissants d'une même solution d'indicateur.

Les résultats sont indiqués dans le tableau III et sur les figures 3 et 4.

La valeur moyenne de K'*a* varie peu tant que la concentration initiale du colorant ne change pas. Le volume de colorant ajouté ne semble pas influencer de manière appréciable la valeur moyenne de K'*a* (ce vo-

Tableau III

Comparaison entre les résultats obtenus avec des doses différentes de purpurate de potassium.

Concentration de la solution de purpurate de potassium (mg purpurate pour 100 ml de solution)	100												200			400		
Quantité de solution colorée ajoutée (en ml pour 100 ml d'échantillon)	1			2			3			4			1			1		
Désignation des échantillons	D. O.	K′a	$\frac{E_a \cdot 100}{E_1}$	D. O.	K′a	$\frac{E_a \cdot 100}{E_1}$	D. O.	K′a	$\frac{E_a \cdot 100}{E_1}$	D. O.	K′a	$\frac{E_a \cdot 100}{E_1}$	D. O.	K′a	$\frac{E_a \cdot 100}{E_1}$	D. O.	K′a	$\frac{E_a \cdot 100}{E_1}$
E_1	0,038			0,068			0,115			0,147			0,085			0,120		
Ea^2	0,065	245	171	0,104	195	153	0,163	198	146	0,190	180	129	0,122	157	143	0,190	280	160
Ea^4	0,078	238	206	0,126	207	185	0,203	230	177	0,225	244	154	0,158	222	186	0,220	264	183
Ea^6	0,088	261	232	0,141	221	208	0,225	246	196	0,246	258	168	0,172	214	203	0,252	345	211
Ea^8	0,095	285	250	0,154	255	227	0,245	295	213	0,270	262	183	0,190	262	224	0,265	362	222
E_2	0,120			0,196			0,300			0,310			0,240			0,315		
Valeur moyenne de K′a		257			220			242			236			214			312	
Écarts entre les valeurs extrêmes de K′a		47			60			97			82			105			98	

Précision de lecture des densités optiques = de ± 0,001 à ± 0,004 pour concentration de 1 à 4 % respectivement.

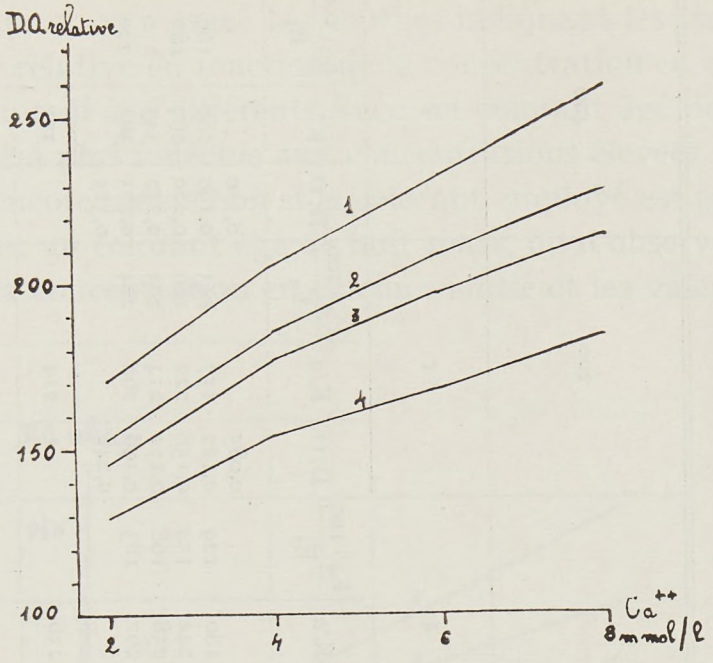


FIG. 3. — Valeur des densités optiques relatives, aux diverses concentrations de Ca^{++}, selon la dose de solution colorante employée. — D. O. : densité optique relative : $\frac{E_a \cdot 100}{E_1}$. — Ca^{++} : Concentrations en mM/l de Ca^{++}. — Courbe 1 : 1 % de purpurate à 100 mg pour 100 ml. — Courbe 2 : 2 % de purpurate à 100 mg pour 100 ml. — Courbe 3 : 3 % de purpurate à 100 mg pour 100 ml. — Courbe 4 : 4 % de purpurate à 100 mg pour 100 ml.

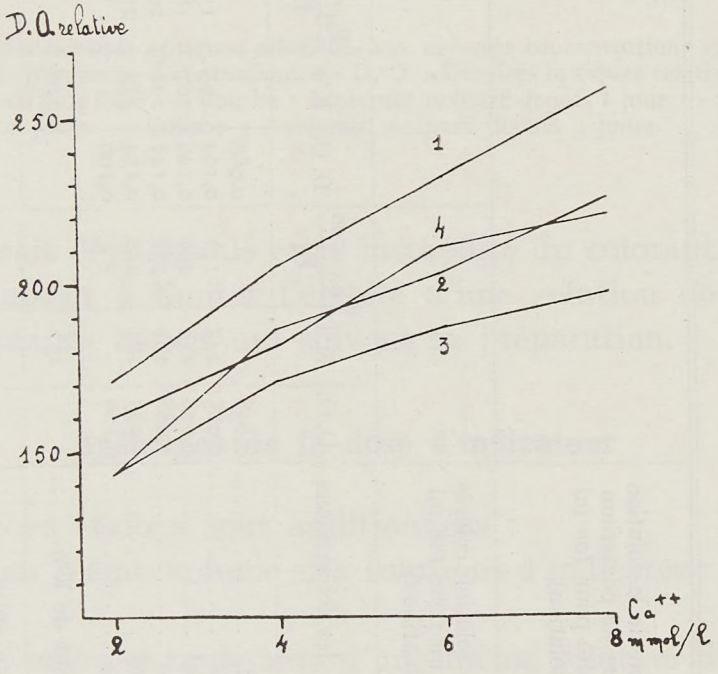


FIG. 4. — Valeur des densités optiques relatives, aux diverses concentrations de Ca^{++}, selon la concentration de la solution colorante employée. — D. O. : Densité optique relative. — Ca^{++} : Concentration en mM/l de Ca^{++}. — Courbe 1 : 1 % de purpurate à 100 mg pour 100 ml. — Courbe 2 : 1 % de purpurate à 200 mg pour 100 ml. — Courbe 3 : 1 % de purpurate à 300 mg pour 100 ml. — Courbe 4 : 1 % de purpurate à 400 mg pour 100 ml.

lume étant le même pour chaque échantillon d'une même série). Par contre, K'a varie lorsque la concentration du colorant en purpurate est elle-même modifiée.

L'écart entre les valeurs extrêmes de K'a dans chaque série est de plus en plus élevé, que l'on augmente le volume de colorant ajouté ou que l'on élève la concentration du colorant en purpurate au-dessus de 0,1 g p. 100 ml.

Les courbes des densités optiques relatives (fig. 2 et 3) montrent qu'en ajoutant 1 p. 100 d'une solution de purpurate à 0,1 g p. 100 ml, on obtient un bon alignement des points sur une droite dont le coefficient angulaire (k = 13) permet une lecture précise (± 0,05 mM/l de calcium ionisé) ; pour les autres concentrations d'indicateur, la courbe des densités optiques s'infléchit et devient irrégulière.

Influence de la nature de l'indicateur

Nous avons comparé le purpurate de potassium préparé et purifié selon la méthode indiquée par SMEETS et le murexide « pur pour analyse » vendu dans le commerce. Les deux colorants en solution à 80 mg p. 100 ml ont été ajoutés à la dose de 1 p. 100 aux solutions de calcium.

Le tableau IV montre que les résultats sont identiques avec les deux colorants utilisés. Le murexide du commerce est donc maintenant suffisamment pur, ce qui n'était pas le cas pour SMEETS.

TABLEAU IV

Comparaison entre les résultats obtenus avec le purpurate de potassium et avec le murexide.

Désignation des échantillons	Avec 1 % de Purpurate de K à 80 mg p. 100 ml			Avec 1 % de Murexide à 80 mg p. 100 ml		
	Densité optique	K'a	$\frac{E_a \cdot 100}{E_1}$	Densité optique	K'a	$\frac{E_a \cdot 100}{E_1}$
E_1	0,100			0,083		
Ea^2	0,148	200	148	0,128	218	155
Ea^3	0,169	—	169	0,146	—	177
Ea^5	0,187	212	187	0,161	223	195
E_2	0,269			0,231		
Valeur moyenne de K'a.		206			220	
Solution à 3,5 mM/l de Ca	Calcium trouvé 3,40 mM/l			Calcium trouvé 3,40 mM/l		

Influence de la durée de coloration

Les lectures sont effectuées à des intervalles de temps définis après coloration des diverses solutions étalons. Le temps écoulé entre l'addition du colorant et le moment de la lecture a varié de 10 minutes à 5 heures.

Les résultats n'ont pas permis d'observer de différences significatives. Toutefois il est possible de noter que l'écart entre les valeurs extrêmes de K'*a* aux concentrations utilisées est minimum pour des durées de coloration allant de 1 h. 1/2 à 2 h. 1/2 (fig. 5).

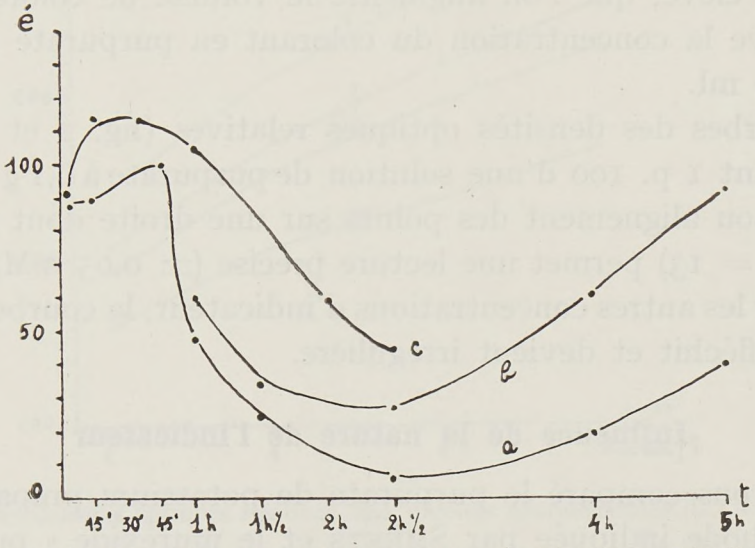


FIG. 5. — Importance des écarts entre les valeurs extrêmes de K'*a* d'une série d'essais aux diverses concentrations en Ca^{++}, en fonction du temps de coloration. — Courbe *a* : dose de 1 % de purpurate à 100 mg pour 100 ml. — Courbe *b* : dose de 1 % de purpurate à 150 mg pour 100 ml. — Courbe *c* : dose de 1 % de purpurate à 200 mg pour 100 ml. — *é* : écarts entre les valeurs extrêmes de K'*a*. — *t* : temps de coloration.

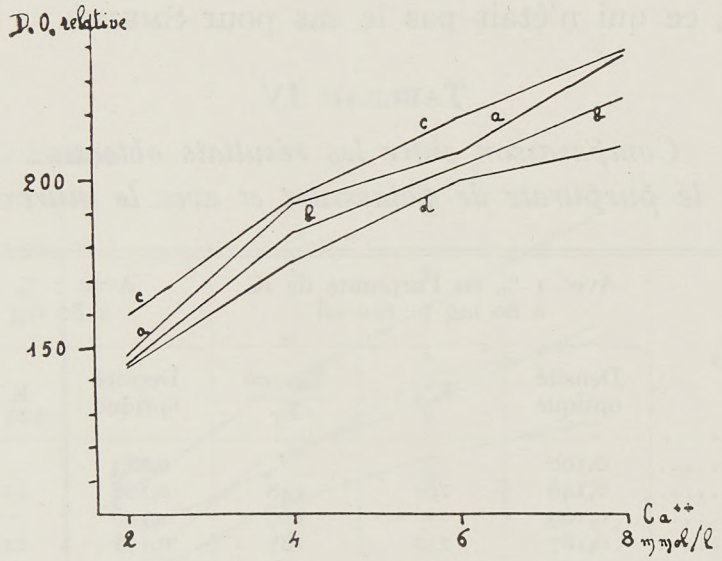


FIG. 6. — Valeurs des densités optiques relatives, aux diverses concentrations en Ca^{++}, obtenues après des temps de coloration variables. — D. O. : Densités optiques relatives. — Ca^{++} : Concentrations en mM/l de Ca^{++}. — Courbe *a* : après un temps de coloration de 15 minutes. — Courbe *b* : après un temps de coloration de 1 heure. — Courbe *c* : après un temps de coloration de 1 h. 1/2. — Courbe *d* : après un temps de coloration de 2 h. 1/2.

Les courbes des densités optiques relatives (fig. 6) montrent qu'à partir d'une durée de coloration de 1 heure, les points sont à peu près alignés sur une droite, mais qu'après 2 heures de coloration, cet alignement devient moins bon et l'on obtient une courbe qui s'infléchit aux concentrations élevées.

Un temps de coloration de 1 h. 1/2 semble le plus recommandable. Si l'on veut par ailleurs comparer plusieurs échantillons entre eux, il faut les examiner toujours après la même durée de coloration.

Influence de la température à laquelle sont conservés les échantillons pendant la coloration

Les échantillons colorés sont maintenus à des températures différentes et examinés successivement après des durées de coloration variables. Aux températures inférieures à 15°C et supérieures à 20°C, la densité optique est instable dans la plupart des cas. A 18°C la densité optique reste sensiblement stable aux différentes concentrations lorsque la durée de coloration est comprise entre 1 heure et 2 h. 1/2.

Action de la lumière

Deux séries des diverses solutions étalons ont été conservées pendant 1 h. 1/2 à 18°C après avoir reçu des doses identiques de colorant, une série était placée à l'obscurité et l'autre à la lumière diffuse du laboratoire. Aucune différence n'a été constatée entre les deux séries.

ESSAI DE MESURE A L'ÉLECTROPHOTOMÈTRE

Les essais suivants ont eu pour but de déterminer les exigences de la méthode de SMEETS en ce qui concerne la longueur d'onde utilisée pour la mesure ; on peut envisager, en effet, de remplacer le spectrophotomètre par un électrophotomètre.

Types d'appareils utilisés

Les résultats obtenus avec le spectrophotomètre Beckman (1) à 480 mμ ont servi de terme de comparaison avec ceux fournis par les autres appareils utilisés. Ces derniers étaient les suivants :

A. — Un modèle monocellule, à lecture directe par milliampèremètre ; bandes passantes de 465 mμ et 495 mμ (Électrosynthèse).

B. — Un appareil monocellule, à lecture directe par galvanomètre à spot très sensible ; bandes passantes de 470 mμ et 490 mμ (Électrosynthèse).

C. — Un modèle à deux cellules en opposition, à lecture de zéro par galvanomètre à spot ; bandes passantes de 460 mμ et 490 mμ (MEUNIER).

(1) Nous remercions le Professeur CORMIER, Directeur du Service Pharmacie à l'Hôtel-Dieu de Rennes, d'avoir mis cet appareil à notre disposition.

D. — Un modèle à deux cellules en opposition, à lecture de zéro par galvanomètre à aiguille ; bandes passantes de 470 mμ et 490 mμ (JOBIN et YVON).

Chacun de ces appareils est muni d'un stabilisateur de courant.

Protocole des essais

L'indicateur est ajouté dans la proportion de 0,1 ml pour 10 ml de solution à examiner. La mesure de la densité optique est effectuée d'une part au spectrophotomètre à 480 mμ et, d'autre part, avec les électrophotomètres. Six lectures successives sont effectuées pour chaque échantillon et avec chaque appareil ; les écarts sont notés pour évaluer la précision de la lecture et la moyenne est prise en considération pour les calculs ultérieurs. La valeur de K'*a* et la concentration en calcium ionisé sont déterminées pour chaque série d'essais, comme dans la méthode originale.

Résultats

Les résultats sont indiqués dans le tableau V. Les densités optiques des différentes solutions mesurées aux longueurs d'onde 490 mμ et 495 mμ sont, quel que soit l'appareil, trop rapprochées les unes des autres pour que les différences entre ces densités soient significatives. Les résultats obtenus avec ces longueurs d'ondes ne sont donc pas mentionnés sur le tableau V.

Par rapport aux solutions étalons, la variance des résultats est de :

± 0,10 mM/l de calcium ionisé avec le spectrophotomètre Beckman.

± 0,32 mM/l de calcium ionisé avec l'électrophotomètre A.

± 0,10 mM/l de calcium ionisé avec l'électrophotomètre B.

± 0,25 mM/l de calcium ionisé avec l'électrophotomètre C.

La variance des résultats obtenus avec chacun des électrophotomètres, sur les solutions standard et sur des ultrafiltrats de lait, par rapport à ceux obtenus avec le spectrophotomètre, a été également calculée:

Par rapport aux résultats lus au spectrophotomètre :

— électrophotomètre A : ± 0,46 mM/l de calcium ionisé ;

— électrophotomètre B : ± 0,09 mM/l de calcium ionisé ;

— électrophotomètre C : ± 0,20 mM/l de calcium ionisé ;

— électrophotomètre D : ± 0,28 mM/l de calcium ionisé.

Les différences observées entre les appareils au point de vue de la précision des résultats montrent qu'il est préférable d'utiliser un électrophotomètre muni :

a) d'un écran coloré de longueur d'onde le plus proche possible de 480 mμ dans la bande du spectre comprise entre 460 mμ et 480 mμ ;

b) d'un galvanomètre à spot sensible et précis.

La précision que l'on peut attendre du dosage du calcium dans l'ultrafiltrat du lait est de l'ordre de ± 0,1 mM/l de calcium ionisé.

TABLEAU V

Comparaison entre les résultats obtenus avec différents électrophotomètres et ceux obtenus avec le spectrophotomètre.

Concentration en Ca des solutions étalons en mM/l de Ca^{++}	Valeurs de la constante d'association K'a avec l'appareil					Concentration en Ca^{++} trouvée avec l'appareil en mM/l				
	Spectrophotomètre	A	B	C	D	Spectrophotomètre	A	B	C	D
2	190	155	204	177	187	—	—	—	—	—
3	—	—	—	—	—	2,95	2,90	3,10	2,95	—
4	—	—	—	—	202	4,10	3,60	4,05	4,15	—
5	—	—	218	—	—	5,10	4,90	—	5,30	—
6	200	195	—	207	194	—	—	—	—	—
8	—	—	—	—	197	—	—	—	—	—
Valeur moyenne de K'a	195	175	211	192	195					
Écart entre les valeurs extrêmes de K'a	10	40	14	30	15					

Variance des résultats par rapport aux solutions étalons	± 0,10	± 0,32	± 0,10	± 0,25	
Ultrafiltrat 1	3,80	—	—	—	4
Ultrafiltrat 2	2,60	—	—	—	2,65
Ultrafiltrat 3	5	—	—	—	5,35
Ultrafiltrat 4	4,30	4,45	4,30	4,30	—
Ultrafiltrat 5	5,15	5,40	5,15	5,35	—

	Longueur d'onde	Appareil de lecture	Nombre de cellules photoélectriques
Electrophotomètre A	465 mμ	milliampèremètre	monocellule
Electrophotomètre B	470 mμ	galvanomètre à spot	monocellule
Electrophotomètre C	460 mμ	galvanomètre à spot	2 cellules en opposition
Electrophotomètre D	470 mμ	galvanomètre à aiguille	2 cellules en opposition
Spectrophotomètre	480 mμ		

INFLUENCE ÉVENTUELLE DU DÉVELOPPEMENT MICROBIEN ET DE LA FORMATION SUBSEQUENTE D'ACIDE SUR LA TENEUR DU LAIT EN CALCIUM IONISÉ

Si la détermination du calcium ionisé par le procédé de SMEETS ne pose pas de difficulté spéciale lorsque le lait mis en œuvre est du lait frais, immédiatement refroidi et maintenu à la glacière, on peut se demander si le résultat du dosage ne serait pas modifié si l'on partait d'un lait à teneur en microbes élevée et conservé pendant un certain temps après la traite. En effet, les bactéries lactiques, qui sont toujours les plus nombreuses dans le lait, produisent une certaine quantité d'acide lactique dont la présence est susceptible d'une modification de l'équilibre

existant dans le lait entre les différentes formes du calcium. D'autre part le développement microbien entraîne également une altération des différents constituants azotés du lait et notamment de la caséine. Il était donc intéressant de vérifier l'influence possible du développement microbien sous les deux aspects : teneur en calcium ionisé, azote caséine/azote total.

L'essai suivant a été réalisé dans ce but :

Un même échantillon de lait fraîchement trait est réparti dans six flacons stériles. Un des flacons est maintenu dans la glace à 0°C. D'autres sont placés au bain marie à 23°C ou à 31°C pendant des durées variables. A la fin de chaque période d'incubation, le flacon correspondant est immédiatement refroidi dans l'eau glacée et maintenu à 0°C. Lorsque les échantillons ont subi la période d'incubation destinée à permettre le développement de la flore microbienne et ont été tous ramenés (ou maintenus) à 0°C, on effectue les déterminations suivantes : durée de réduction du bleu de méthylène, durée de conservation jusqu'à coagulation par l'alcool et à l'ébullition, teneurs en calcium ionisé et total, azote total, azote de la caséine, et enfin acidité titrable.

Les résultats sont donnés dans le tableau VI.

En comparant les échantillons qui ont subi une incubation préalable au témoin (maintenu constamment à 0°C), on observe chez les premiers, comme il fallait s'y attendre, un raccourcissement de la durée de réduction du bleu de méthylène et de la durée de conservation jusqu'à coagulation, tandis que l'acidité titrable augmente progressivement. Il n'y a que peu ou pas de modifications en ce qui concerne les teneurs en calcium ionisé, tant que la production d'acide lactique est faible (acidité inférieure à 21°D). Tout au plus observe-t-on une légère diminution de cette teneur au début de l'acidification, mais lorsque celle-ci devient supérieure à 21°D, on observe une augmentation rapide de la teneur en calcium ionisé. Une diminution de l'azote caséine, bien que faible et située à la limite de précision de la méthode, est également observée pour un échantillon maintenu 7 h. 1/2 à 31°C.

RÉSUMÉ

Nous avons vérifié certains points de la méthode colorimétrique proposée par Smeets pour le dosage du calcium ionisé dans l'ultrafiltrat de lait. L'étude de la cinétique de la coloration a permis de préciser que, si l'on peut utiliser indifféremment comme indicateur le purpurate de potassium ou le murexide « pur pour analyses », il est nécessaire d'observer un certain nombre de précautions au cours de la coloration. La solution d'indicateur (100 mg de colorant pour 100 ml d'eau distillée), doit être employée à la dose de 1 p. 100 ; elle doit être préparée depuis

Tableau VI

Influence du développement microbien sur la concentration en calcium ionisé.

Numéro de l'échantillon de lait	Incubation préalable à 23° ou 31°C		Durée de réduction du bleu de Méthylène (en heures)	Durée de Conservation (en heures) jusqu'à coagulation par :		Acidité titrable en degrés Dornic	Calcium ionisé dans l'ultra-filtrat p. p. m.	Calcium total en p. 100	Azote total en p. 100	Azote caséine en p. 100
	Durée en heures	Température °C		l'alcool	l'ébullition					
1	8	0	9	16	19	18	98	0,120	0,512	0,405
	3	31	6	15	17	19	98			0,405
	5 1/2	23	5,5	12	14	19,5	96			0,405
	7 1/2	23	5	10	14	20	92			0,403
	5 1/2	31	4	9	11	20	90			0,403
	7 1/2	31	2	7	10	20,5	76			0,402
2	8	0	7	16	22	18	90	0,124	0,567	0,449
	3	31	6	15	19	18,5	90			0,449
	5 1/2	23	4,5	14	17	18	86			0,449
	7 1/2	23	4	10	15	19	78			0,449
	5 1/2	31	3	9	15	19	86			0,446
	7 1/2	31	2	7	14	20,5	86			0,448
3	14	0	7	10	19	18	88	—	—	—
	5	31	1,5	3	10	19	88			
	7	31	1	1	7	20	82			
	9	31	0,25	0	4,5	21,5	96			
	11	31	0	0	3	23	118			
	13	31	0	0	2	24,5	154			
Précision des dosages						± 0,25	± 4	± 0,001	± 0,003	± 0,003

moins de 48 heures au moment de l'emploi. Il est préférable d'effectuer la lecture de la densité optique après avoir conservé les échantillons à 18°C pendant 1 h. 1/2.

Pour la mesure de la densité optique, on peut remplacer le spectrophotomètre par un électrophotomètre à bande passante de longueur d'onde 470 mμ muni d'un galvanomètre à spot sensible et précis.

Nous remercions vivement M. Mocquot, Directeur de la Station Centrale de Recherches Laitières, d'avoir bien voulu nous conseiller pour ce travail.

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

(1) Smeets (W. T. G. M.). — De bepaling van de Calcium ionenconcentratie in milk ultrafiltrat. Betcknib voor het « Utrechtsemilkgebrek ». Thèse Université, Utrecht (1952).

(2) Christianson (G.), Jenness (R.) et Coulter (S. T.). — Determination of ionized Calcium and Magnesium in milk *Analytical Chemistry*, **26,** (12), 1923 (1954).

(3) Van Kreveld (A.) et Van Minnen (G.). — Calcium and Magnesium ion activity in raw milk and processed milk, **9,** (1), 1 (1955).

(4) Seekles (L.) et Smeets (W. T. G. M.). — L'instabilité du lait par suite d'une augmentation de la teneur en ions de calcium. *Le lait*, **34,** (339-340), 610 (1954).

DESULFITATION DES JUS DE RAISIN

PAR

M. FLANZY et P. ANDRÉ

Station centrale de Technologie des produits végétaux,
Narbonne

PLAN DU MÉMOIRE

I. — Introduction.

II. — Les formes de l'anhydride sulfureux dans les jus de raisin.

Anhydride sulfureux libre.
Anhydride sulfureux dissous.
Acide sulfureux.
Sulfites.

Anhydride sulfureux combiné.
Combinaison avec les sucres.
Combinaison avec l'aldéhyde.
Combinaison avec les substances polyphénoliques.

III. — Extraction de SO_2 ou désulfitation.

IV. — Appareils existants.

Appareils discontinus.

Appareils continus.

Appareil I. N. R. A.

V. — Différents types d'appareils I. N. R. A.

Appareil Semi-Industriel.

Appareil Industriel.

VI. — Conclusion.

I. — INTRODUCTION

La valeur pratique de la technique sulfitation-désulfitation et sa comparaison avec les autres techniques utilisées dans l'industrie des jus de raisin ont été déjà précisées (1) (2).

Nous rappelons seulement les caractéristiques avantageuses de la technique basée sur l'emploi de l'anhydride sulfureux.

— Le SO_2 est un antiseptique autorisé.

— Il est le seul à pouvoir être retiré en totalité du jus.

— Ses propriétés antioxygènes le font utiliser dans toute la pratique courante œnologique.

— Cette technique permet de produire de bons jus à un faible prix de revient.

Ce mémoire a pour objet l'exposé des travaux qui ont abouti à la mise au point d'un appareil industriel. Celui-ci devait remplir les 4 conditions suivantes :

1° Conserver au jus le maximum de ses qualités naturelles.

2° Limiter la présence de l'anhydride sulfureux total aux environs de 50 mg/l.

3° Eviter toute concentration ou dilution.

4° Eviter toute affusion d'eau exogène soit par addition directe, soit par injection de vapeur, de manière que l'eau du jus soit vraiment l'eau initiale de constitution et non un mélange d'eau de constitution et d'eau d'addition (eau exogène).

Ces travaux sont précédés d'un rappel de nos connaissances sur les formes de l'anhydride sulfureux dans le jus de raisn.

II. — LES FORMES DE L'ANHYDRIDE SULFUREUX DANS LES JUS DE RAISIN

Anhydride sulfureux libre

On appelle ainsi l'anhydride sulfureux dosé par l'iode en milieu acide. Il comprend :

— l'anhydride sulfureux dissous : SO_2.

— l'acide sulfureux : $SO_3\ H_2$.

— les sulfites : $SO_3\ M_2$ et $SO_3\ MH$.

L'anhydride sulfureux dissous.

Le gaz SO_2 est soluble dans l'eau avec formation d'une combinaison ($SO_3\ H_2$). La solubilité ne suit donc pas à froid la loi de Henry.

Sims (3) a étudié la solubilité de SO_2 en fonction de la température

(au-dessous de 50°) et de la pression. Les résultats sont portés sur la figure 1.

On constate que la quantité de SO_2 à saturation est une fonction logarithmique de la température, cette quantité est d'autant plus faible que la température est plus haute et la pression moins élevée.

Au-dessus de 50°C on admet que le SO_2 suit la loi de HENRY.

Les quantités de SO_2 dissoutes sont de toutes manières très supé-

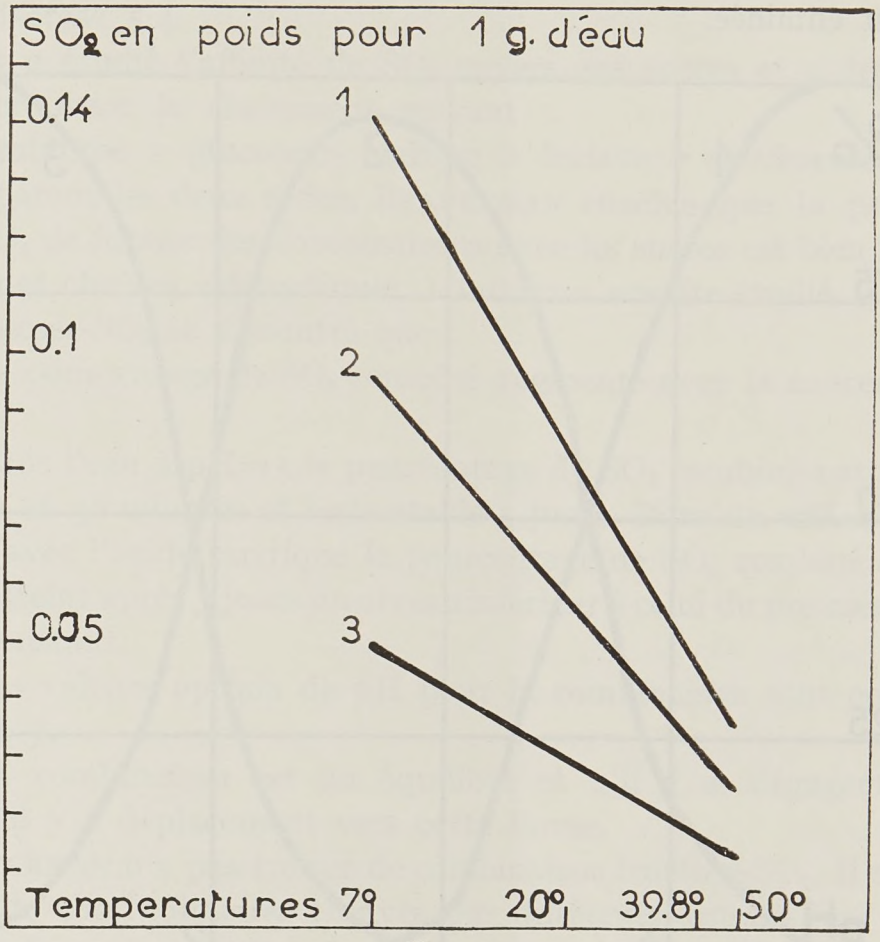


FIG. 1
1 : 600 mm. Hg 2 : 400 mm. Hg 3 : 200 mm. Hg

rieures à celles tolérées dans un jus (100 mg/l de SO_2 total). On constate que la dépression a plus d'influence sur l'élimination du SO_2 que la température.

Il est nécessaire d'utiliser des pressions de l'ordre de 200 mm de Hg et des températures supérieures à 50°.

L'acide sulfureux, les sulfites.

De nombreux auteurs ont étudié les proportions des différentes formes du SO_2 libre dans les vins (4) (5) ou les jus (6).

La figure 2 reproduit le graphique de VAS et INGRAM (6). En abscisse

est marqué le pH, en ordonnée le pourcentage de la forme étudiée par rapport à la totalité du SO_2 libre. Ce SO_2 libre correspond à la définition que nous avons donnée ci-dessus (anhydride + acide sulfureux + sulfites neutres et acides).

La plus grande partie est sous forme de SO_3H. La proportion de SO_3H_2 est faible et varie de 10 p. 100 (pH = 2,8) à 1 p. 100 (pH = 3,8) ; c'est la forme qui est éliminable par la chaleur et le vide mais comme il s'agit d'un équilibre il y a déplacement vers cette forme au fur et à mesure qu'elle est éliminée.

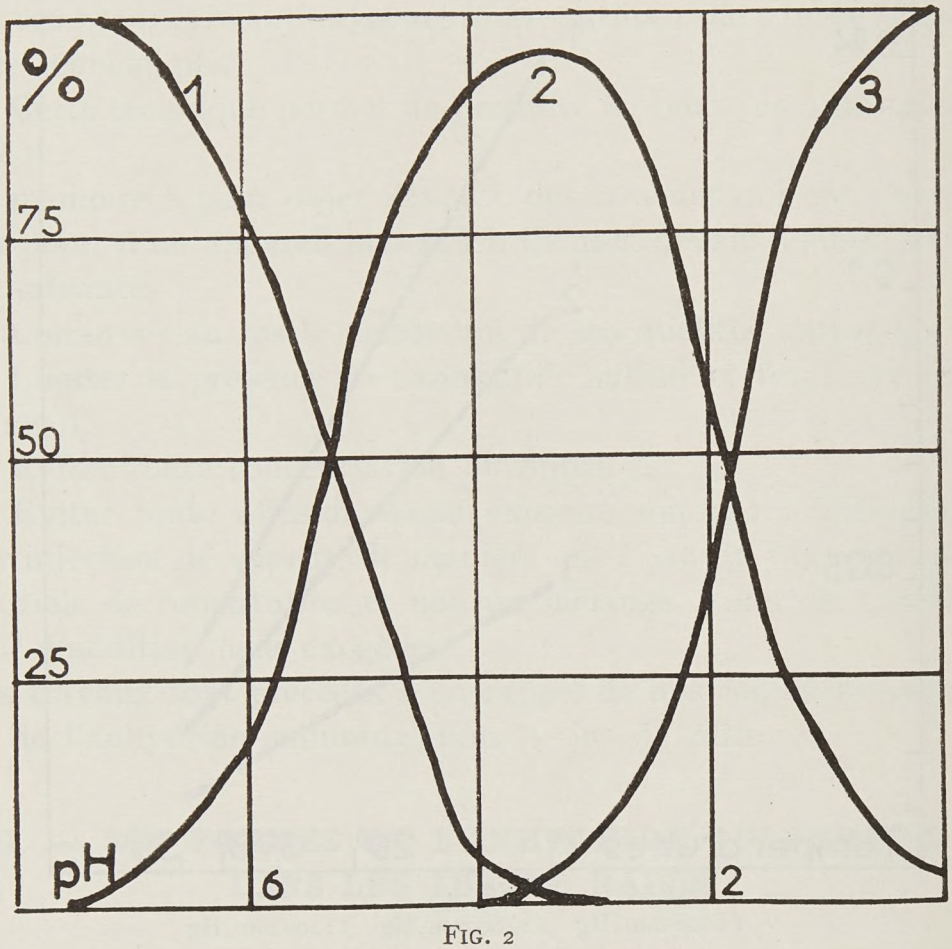


FIG. 2
1 : $SO_3^=$ 2 : HSO_3^- 3 : H_2SO_3

Anhydride sulfureux combiné.

Le SO_2 se combine dans les moûts avec les corps à fonction aldéhydique.

Combinaison avec les sucres.

MOREAU et VINET (7) ont les premiers étudié cette combinaison pour les vins blancs doux et ont montré que le SO_2 ajouté à un moût se combine d'abord en totalité (indice T) et ensuite la proportion de SO_2 libre/SO_2 combiné est constante pour un vin donné (indice R).

De nombreux auteurs ont étudié les combinaisons du SO_2 avec

les sucres. BRAVERMAN (8) a passé en revue les différents travaux. Pour cet auteur le SO_2 ne pourrait se combiner avec les chaînes ouvertes d'aldéhyde, cette forme est toujours présente en petite quantité dans l'équilibre de β et β-α glucose.

L'auteur compare les travaux de BERG, de STEPANENKO et SERDYUK (11). Ceux-ci ont déterminé les quantités relatives de la forme aldéhydique dans des solutions de sucres :

— arabinose 26, d-xylose 21, d-galactose 15, glucose 12, maltose 6,5, lactose 5,4.

BERG a étudié l'affinité de SO_2 envers des sucres et a établi par ordre décroissant le classement suivant :

— arabinose > glucose > maltose > lactose > saccharose.

Comparant les deux séries, BRAVERMAN conclue que la possibilité pour le SO_2 de former des combinaisons avec les sucres est bien liée à la présence des chaînes aldéhydiques. L'auteur a ensuite étudié la combinaison glucose-SO_2 et a montré que :

1° Le pourcentage de SO_2 combiné augmente avec la concentration en glucose.

2° Dans l'eau à pH=5 le pourcentage de SO_2 combiné a atteint son maximum en 30 minutes et reste stable 5 jours. Dans un milieu acidifié à pH-2,1 avec l'acide tartrique le pourcentage de SO_2 combiné est plus faible et atteint après 3 jours un niveau inférieur à celui du premier liquide et reste constant.

3° Les valeurs optima de pH pour la combinaison sont comprises entre 5 et 7.

4° La combinaison est un équilibre et s'il y a dégagement de SO_2 libre il y a déplacement vers cette forme.

BRAVERMAN n'a pas trouvé de combinaison fructose-SO_2. Il explique les résultats contradictoires trouvés par différents auteurs par le fait que ceux-ci auraient utilisé du fructose pur.

M. GEHMANN et E. M. OSMAN (9) ont particulièrement étudié la combinaison glucose-bisulfite. Ils ont abouti aux mêmes conclusions que BRAVERMAN :

La proportion de SO_2 libre est d'autant plus élevée que la température est plus haute (température extrême étudiée 40°), que le pH est plus bas, et elle est d'autant plus faible que la quantité de sucres est grande.

Combinaison avec l'aldéhyde $CH_3 - \underset{\underset{H}{|}}{C} = O$.

L'acétaldéhyde n'est pas naturellement présent dans les moûts. Il peut se trouver présent dans les jus ayant subi un début de fermentation, puisque CH_3COH est un produit intermédiaire du métabolisme fermen-

tatif des sucres. Il se combine avec le SO_2 sous forme d'acide aldéhydo-sulfureux CH_3-CHOH-SO_3 H, la vitesse de combinaison est maximum à pH = 7.

La combinaison est stable dans les milieux à pH bas (12) et très volatil, sa constante de volatilité est de l'ordre de 20 (13).

Tous les auteurs ne sont pas d'accord : pour JAULMES la combinaison se distillerait sans être décomposée, pour MOREAU et VINET, RIBEREAU-GAYON et PEYNAUD, cette combinaison serait dissociée au moment de la distillation et se reconstituerait dans le distillat.

Or, ceci est particulièrement important pour la désulfitation. Si la combinaison très volatile reste stable, elle distillera en nature et on la retrouvera dans le jus désulfité, ce qui augmentera d'autant la dose de SO_2 final. Si elle est décomposée, les conditions d'appareillage étant telles que le SO_2 est éliminé, l'équilibre sera naturellement déplacé vers le SO_2 libre qui est éliminé.

Les derniers travaux (12) montrent bien que l'acide acétaldéhyde sulfureux distille en nature, sans être décomposé. Ceci explique la difficulté de désulfiter les jus ayant subi un début de fermentation.

A ce sujet l'expérience suivante est concluante :

On a pris un jus de raisin conservé à froid et ayant subi un début de fermentation. Il titre 1° d'alcool.

Une partie A de ce jus est mutée à raison de 1 g. de SO^2 par litre, abandonnée une semaine et désulfitée ensuite.

Une partie B est mutée à raison de 100 mg /litre. Elle est laissée 12 heures au frigorifique pour empêcher la fermentation, tout en laissant le temps à la combinaison aldéhyde-anhydride sulfureux de s'effectuer. La désulfitation a donc lieu après ce laps de temps.

Les deux jus traités dans le même appareil, dans les mêmes conditions de chauffage, de vide et de débit, ont eu un SO_2 résiduaire de 80 mg-l. correspondant à peu près exactement à l'éthanal présent (55 mg-l). C'est dire que le chauffage ne détruit pas la combinaison, mais qu'elle distille en l'état et se retrouve dans le distillat.

Combinaison avec les substances polyphénoliques.

Bien qu'il s'agisse de composés extrêmement importants (14) car ils intéressent la technologie des jus de macération, leur composition n'est pas connue.

La pratique montre que le SO_2 se combine en proportion très importante avec les matières polyphénoliques ; il est nécessaire en effet de prévoir pour les jus macérés des doses environ doubles des doses exigées par les jus de goutte correspondants.

Il s'agit vraisemblablement de composés qui se dissocient aux pH

bas. En effet, on trouve fréquemment des mutés de macération qui fermentent alors que la dose de SO_2 libre trouvée par la méthode RIPPERT est supérieure à 400 mg/l. Avec une telle quantité de SO_2 libre la fermentation ne peut se produire (17). On peut donc admettre qu'il s'agit de SO_2 provenant de composés existant au pH naturel du jus, mais dissocié aux pH acides du titrage RIPPERT.

Ces composés paraissent stables et sont dissociables par la chaleur, mais plus difficilement que le complexe glucose-bisulfite.

On connaît le rôle antioxygène du SO_2. On admet généralement qu'il bloque les polyphénol-oxydases (15-16) et intervient au stade orthodiphénol $\xrightarrow{\text{oxydation}}$ orthoquinone.

En présence de SO_2 on constate en effet une nette diminution des orthoquinones formées.

III. — EXTRACTION DE SO_2 OU DÉSULFITATION

On a vu que l'état des différentes combinaisons dépend de 2 facteurs : pH et température.

Le pH est un facteur fixe. Celui des jus est en général dans la zone de pH optimum de désulfitation (19).

La température est le facteur variable étudié par différents auteurs (17-18).

Ceux-ci utilisent, d'une façon générale, un ballon surmonté d'un réfrigérant, le haut de celui-ci est réuni au système de vide. En réglant ce dernier on peut faire varier à volonté la température d'ébullition à l'intérieur du ballon.

NEGRE, AFFRE et MARICHAL (17) ont particulièrement étudié les températures comprises entre 55 et 75° ; FLANZY (18) les températures supérieures.

Les résultats ne sont pas comparables entre eux, car il y a : d'une part, l'influence du muté et de la dose de SO_2 initiale et, d'autre part, il faut tenir compte du facteur important : l'appareillage lui-même.

La loi tolère au maximum 100 mg de SO_2 total par litre (jus de la catégorie B) et 50 mg de SO_2 total par litre (jus de la catégorie A.) On verra qu'une redissolution du SO_2 dans le réfrigérant peut augmenter sensiblement la dose de SO_2 finale.

Les courbes de désulfitation.

On a établi les courbes de désulfitation en utilisant l'appareillage de l'un de nous (18). Il s'agit d'un ballon de 2 litres relié par un rodage à un réfrigérant à olives. Le diamètre intérieur du réfrigérant est de 25 mm, le diamètre intérieur du tuyau de départ vers la pompe à vide est de 10 mm.

Le volume se trouvant au-dessus du jus muté, les diamètres précités et la forme de l'appareillage sont tels que le SO_2 qui se dégage ne peut se redissoudre dans l'eau de condensation ; celle-ci s'écoule exactement le long des parois intérieures.

Les résultats sont portés sur la figure 3.

On voit que le SO_2 s'élimine d'autant plus facilement que la tempé-

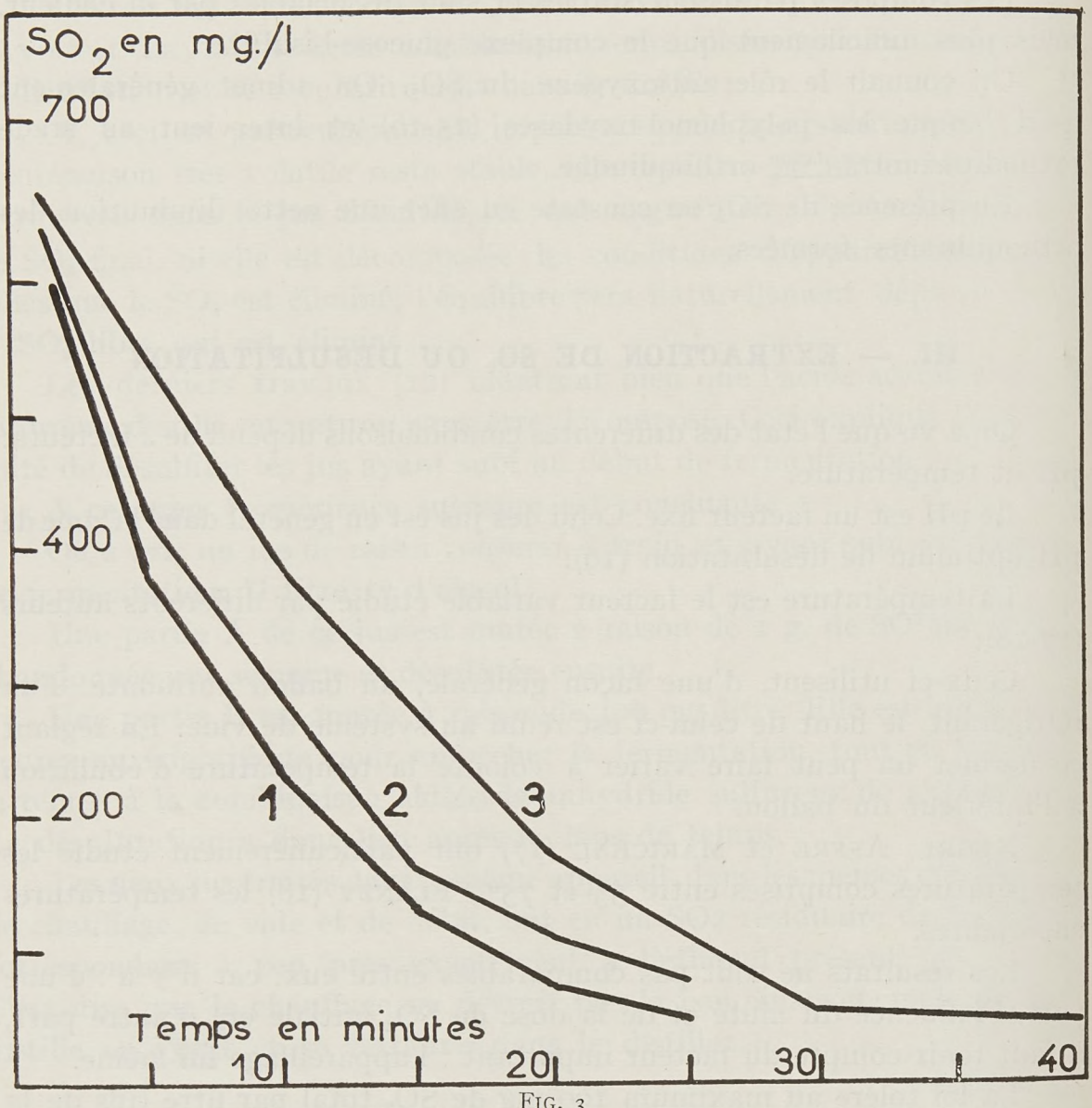


FIG. 3
Températures d'ébulition 1 : 95°C 2 : 87°C 3 : 77°C

rature d'ébullition est élevée, c'est-à-dire que la pression est plus haute. C'est donc la vitesse de libération du SO_2 de ses combinaisons qui règle la vitesse de désulfitation et quelles que soient les conditions elles sont suffisantes pour éliminer le SO_2 libre.

Au cours d'une opération à température d'ébullition constante, la vitesse de désulfitation diminue au fur et à mesure que le SO_2 diminue.

La figure 3 a été établie en utilisant 1 litre de muté dans un ballon de 2 litres.

La figure 4, ci-dessous indiquée a été faite en utilisant 1/2 litre de muté dans ce même appareillage.

Par la réduction du volume du jus, mais en maintenant la même surface libre, on a augmentation très nette de la vitesse de désulfitation. La courbe 3 de la figure 4 obtenue à 77°C est superposable à la courbe 1 de la figure 3 obtenue à 95°C.

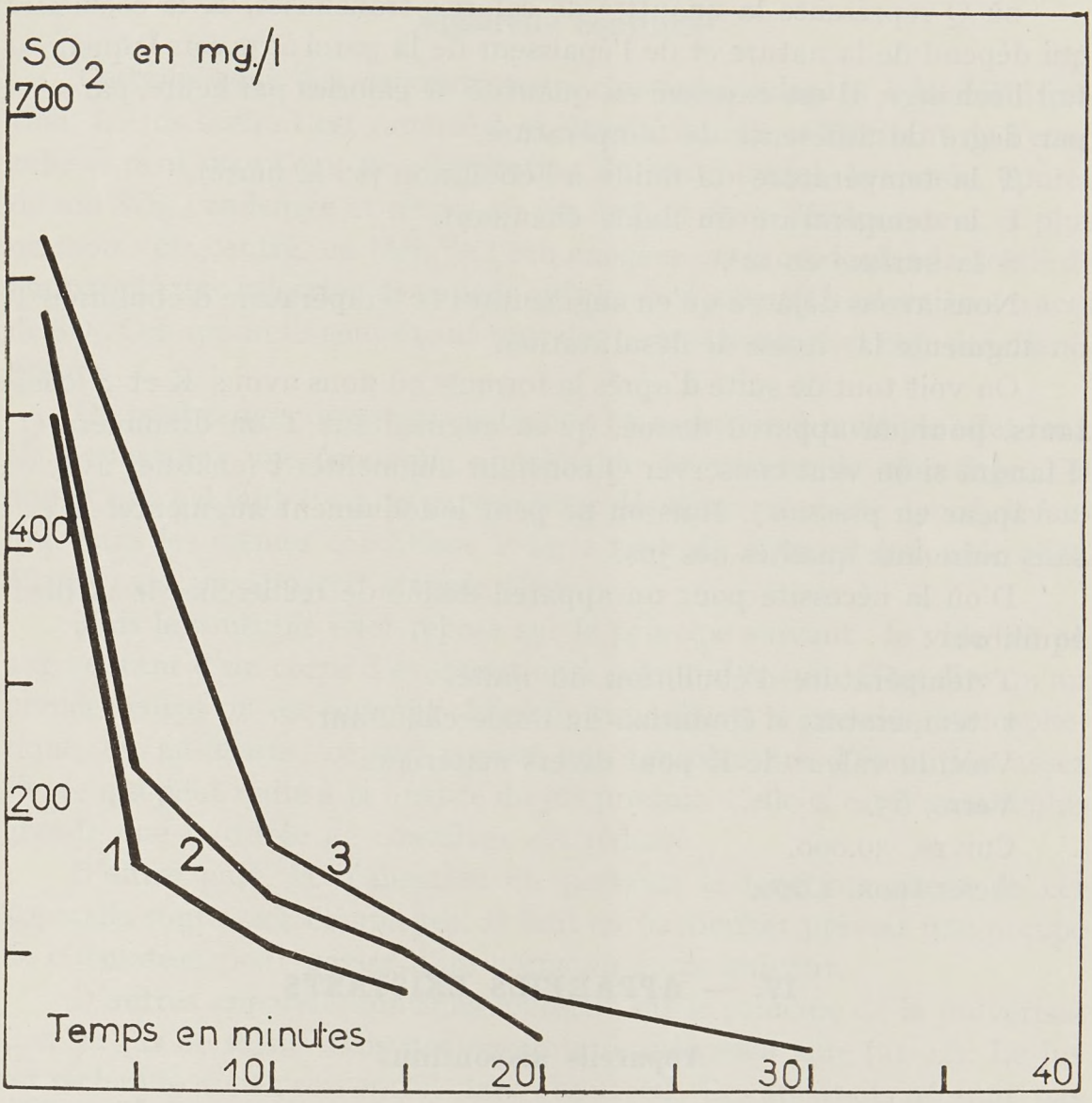


FIG. 4
Températures d'ébullition 1 : 95°C 2 : 87°C 3 : 77°C

Dans le premier cas, la hauteur de liquide soumise à l'ébullition est de 40 mm et de 63 mm dans le second.

Une couche de hauteur plus faible donne encore de meilleurs résultats. C'est sur le principe de la nappe liquide mince qu'on a établi l'appareil dont on parlera au dernier chapitre.

D'autres facteurs inhérents à l'appareillage sont la quantité de calories transmises et la vitesse de cette transmission. Ils permettent d'obtenir

une ébullition plus ou moins vive.Comme l'a signalé l'un de nous (18) une vive ébullition favorise la désulfitation par l'agitation produite dans le liquide et par la plus grande masse de vapeur produite. Le brassage mécanique du liquide est encore un facteur améliorant.

La quantité de calories transmises est donnée par la formule :

$$Q = K_{D.M.H.} (t - T) \times S.$$

où Q représente la quantité de calories transmises, K le coefficient qui dépend de la nature et de l'épaisseur de la paroi à travers laquelle se fait l'échange. Il est exprimé en quantité de calories par heure, par m^2 et par degré de différence de température.

T la température du fluide à l'ébullition (ici le muté).

t la température du fluide chauffant.

S la surface en m^2.

Nous avons déjà vu qu'en augmentant la température d'ébullition T, on augmente la vitesse de désulfitation.

On voit tout de suite d'après la formule où nous avons K et S constants, pour un appareil donné, qu'en augmentant T on diminuera Q ; il faudra si on veut conserver Q constant augmenter t (chauffer avec de la vapeur en pression). Mais on ne peut indéfiniment augmenter T et t sans nuire aux qualités des jus.

D'où la nécessité pour un appareil donné de rechercher le meilleur équilibre :

T température d'ébullition du muté.

t température d'ébullition du fluide chauffant.

Voici la valeur de K pour divers matériaux :

Verre, 65.

Cuivre, 30.000.

Acier Inox, 1.000.

IV. — APPAREILS EXISTANTS

Appareils discontinus

Ils consistent essentiellement en un récipient surmonté d'un réfrigérant et sont l'application directe des travaux signalés (17-18-20). Leur fonctionnement est très simple, mais les temps de chauffe sont en général assez longs. On opère par ébullition à une température donnée (17), on applique les principes que nous avons vus (18) : dans un premier temps à haute température on décombine le SO2, dans un deuxième temps, sans chauffer, on élimine le SO_2 qui est alors sous la forme libre en augmentant graduellement le vide. Cette méthode présente l'avantage de ne chauffer le muté que lorsque la dose de SO_2 est encore élevée et les temps de chauffe sont plus courts.

Un autre type consiste à entraîner le SO_2 par une injection de vapeur. Dans ce cas, l'eau de composition du jus est constituée par fractions indéfinies : partie d'eau de constitution et partie d'eau d'injection ou exogène. Au contraire dans le type précédent l'eau de composition des jus est constituée exclusivement par l'eau de constitution ou eau endogène.

Sur ces principes ont été réalisés et existent des appareils industriels.

Appareils continus

Certains sont des concentrateurs classiques adaptés à la désulfitation. Le jus sortant est ramené à sa densité initiale en ajoutant de l'eau ; celle-ci peut être l'eau de constitution du muté initial, évaporée, épurée de son SO_2, condensée et réunie au jus restant dans l'évaporateur et plus ou moins concentré, ou bien de l'eau exogène en procédant à la sortie de l'appareil à une injection de vapeur qui chasse d'ailleurs les dernières traces de SO_2. Ces appareils sont avant tout des concentrateurs et non des désulfiteurs.

On peut ranger dans cette catégorie les appareils à multiple effet (20). Ils permettent une économie appréciable de vapeur de chauffage. On admet que s'il faut P kg de vapeur pour désulfiter un muté donné, il faudra, dans les mêmes conditions P kg/2 avec un appareil à double effet, Pkg/3 avec un appareil à triple effet.

Mais le multiple effet repose sur le principe suivant : le vide va en augmentant d'un corps d'évaporation à celui qui le suit. C'est dire qu'au premier corps on est souvent obligé de travailler à la pression atmosphérique, ou au-dessus, ce qui impose une température d'ébullition assez élevée qui peut nuire à la qualité du jus produit. Celle-ci est d'autant plus grande que la durée de chauffage est réduite.

D'autre part, la réalisation et, partant, le fonctionnement de ces appareils sont assez complexes. Il faut en particulier prévoir une pompe de circulation pour passer d'un corps au corps suivant.

D'autres appareils continus reposent sur le principe de la pulvérisation du jus de raisin dans une enceinte fermée sous vide (21-22). Le jus est réchauffé avant son entrée dans l'appareil. Ces appareils ne sont pas en général munis de réfrigérant, il y a donc entraînement de vapeur d'eau en même temps que de l'anhydride sulfureux. Il y a aussi un brassage du jus assez énergique qui s'effectue parfois avec introduction d'air ce qui nuit à la qualité du jus produit.

Appareil I. N. R. A.

On a réalisé un type d'appareil continu utilisant le principe de la nappe mince et continue.

Il est inutile de passer en revue les avantages industriels de la conti-

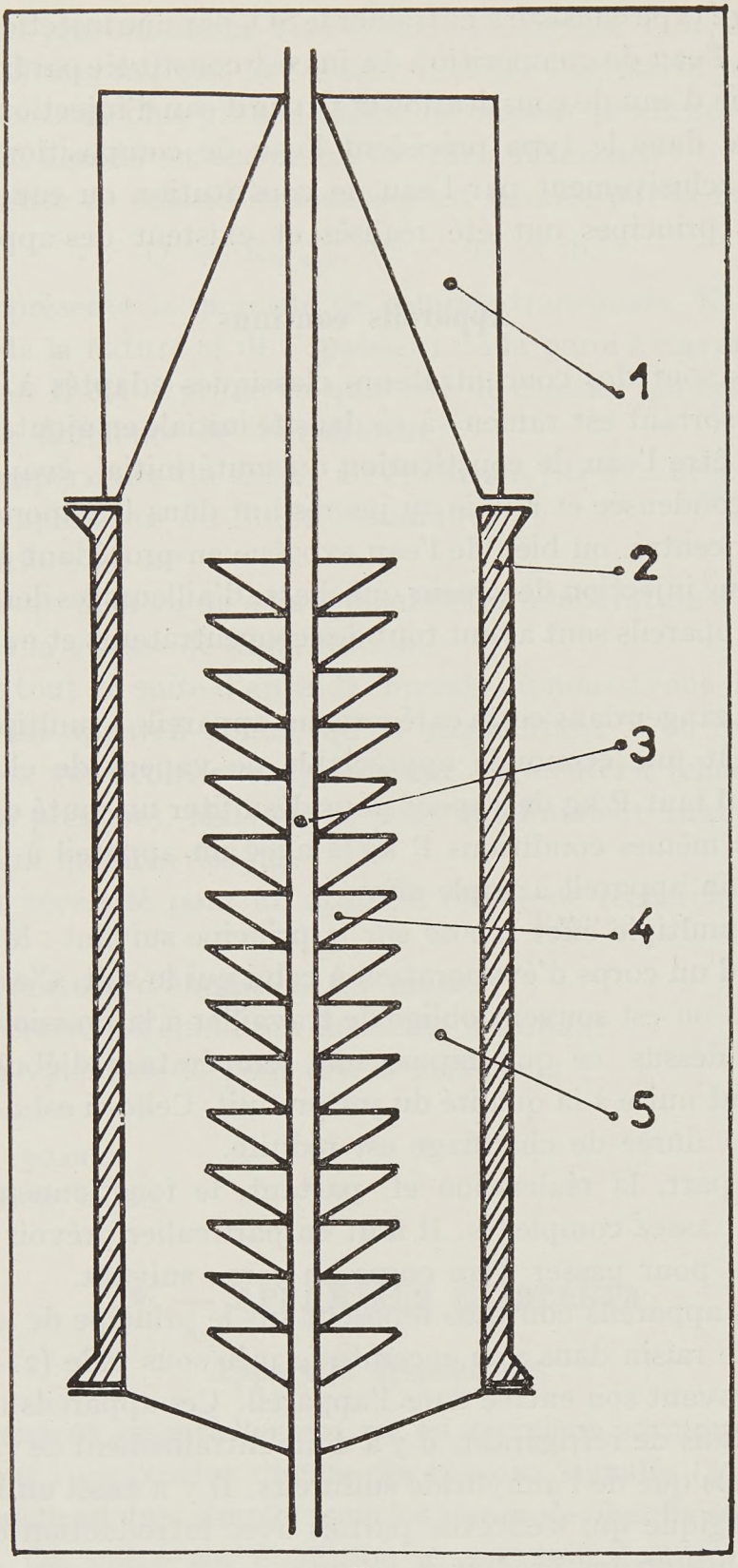


FIG. 5
1 : Refrigérant 2 : Colonne de verre 3 : Tube porte-godets 4 : Godet 5 : Chambre de désulfitation.

nuité. Un des plus intéressants pour le jus de raisin est le suivant :

La température d'ébullition adoptée peut être choisie pour que le jus à la sortie de l'appareil soit à une température telle que l'on puisse procéder à un embouteillage à chaud, ce qui supprime une pasteurisation.

Le premier appareil étudié (fig. 5) était constitué par un tube de cuivre appelé porte-godets (*3*); sur ce tube étaient enfilés des godets (*4*) en forme de tronc de cône renversé. Ce tube était passé dans un tube de verre (*2*). Le tout était surmonté d'un réfrigérant tronconique (*1*).

Le tube porte-godet est chauffé d'une façon continue à l'intérieur par la vapeur à pression normale ; pendant ce temps le muté s'écoule le long de ce tube d'un godet à l'autre (il n'y a donc jamais mélange muté-vapeur).

Dans chaque godet le jus est soumis à l'ébullition suivant le principe de la nappe mince (ébullition instantanée avec vive agitation).

La température d'ébullition est réglée par le vide que l'on peut fixer à n'importe quelle valeur dans l'enceinte (*5*).

La vapeur dans la chambre de l'appareil sort ainsi constituée :

— Vapeur d'eau de constitution du jus.

— SO_2 aspiré vers la pompe à vide en relation avec un barbotteur à lait de chaux.

L'appareil étant en état de marche on a :

— le long de la colonne porte-godets un courant descendant de jus muté qui se désulfite. Le long de la colonne de verre (à l'intérieur) l'eau condensée de constitution du jus parfaitement désulfitée.

Jus et eau descendants se réunissent à la partie inférieure. Dans tous les cas la richesse saccharique de l'ensemble était bien celle du jus initial. On n'avait donc ni concentration, ni dilution, sensibles.

Les recherches ultérieures ont porté sur la forme et la dimension des godets, le diamètre relatif de la colonne à godets et de la colonne extérieure, les modifications nécessitées par la recherche de débits de plus en plus élevés.

Toutes ces recherches nous ont permis de déterminer les meilleures dimensions relatives, les facteurs physiques les plus recommandables : pression et débit.

Pression. Les meilleurs résultats sont obtenus avec une pression de 50 cm de Hg. Au-dessous la température d'ébullition est trop faible et la désulfitation de SO_2 combiné plus prolongée, à moins d'allonger la colonne à godets ce qui augmente encore l'encombrement.

La température d'ébullition est voisine de 85°.

Le *préchauffage* du jus à 80° augmente le rendement ainsi que le montrent les résultats suivants :

Pression en cm de Hg	SO_2 total en mg/l	Débit en l/heure	SO_2 total restant	Modalités
49	735	2,4	51	Réchauffeur
49	735	4,5	100	Réchauffeur
49	735	2,4	120	Sans réchauffeur
49	735	4,5	170	Sans réchauffeur

On a encore constaté qu'il est préférable d'utiliser une colonne de 1,20 m que deux colonnes de 0,60 m. Les résultats suivants le montrent fort bien :

Pression en cm de Hg	SO_2 total en mg/l	Débit en l/heure	SO_2 total restant	Colonnes
51	730	6	128	2 × 0,60
51	730	6	51	1,20

Possibilités de redissolution de SO_2.

Les dispositifs d'appareillage sont tels que le SO_2 dégagé ne traverse jamais par barbottage la couche liquide de muté en cours de désulfitation, ou la couche aqueuse descendante condensée.

C'est le contact entre celle-ci et le courant ascendant de SO_2 qui pourrait amener la dissolution d'une certaine quantité de SO_2. Celle-ci est essentiellement fonction de la température ainsi que le prouve l'expérience suivante faite avec une colonne de 60 cm.

Dans les conditions habituelles de fonctionnement l'eau de condensation est à la température moyenne de 60°. Elle est exempte de SO_2. Si on réfrigère cette colonne extérieure de manière à amener la température de l'eau de condensation à + 20°C on constate qu'il y a augmentation de la dose finale de SO_2 de 60 à 100 mg par litre.

Les éléments de la colonne de 0,60 m étaient les suivants :

— 40 calottes pour 0,60 m de longueur utile. Chaque calotte était percée d'un trou de telle sorte que la calotte en fonctionnement soit pleine sans déborder.

Ces dimensions ont permis par extrapolation d'établir les appareils suivants construits en acier inox 18/8 au molybdène.

V. — DIFFÉRENTS TYPES D'APPAREILS I. N. R. A.

Appareil semi-industriel.

Le principe est le même que celui de l'appareil déjà décrit. La forme de chaque calotte est représentée sur la figure 6. Chacune d'elles est percée. Le diamètre du trou est calculé pour que la calotte, à un débit moyen de 40 l/heure, soit pleine sans déborder et que la hauteur de la nappe soit à ce moment de 25 mm au maximum.

Si le débit est supérieur (60 l-h) le profil est tel que l'excédent de jus s'écoule le long de la paroi extérieure sans phénomène de cascade, celui-ci amenant toujours une redissolution du SO_2, ce qu'il faut éviter.

Sur la photo 1, on remarque qu'il y a trois séries de calottes :

Les petites en haut de diamètre extérieur 90 mm.

Les moyennes au milieu de diamètre extérieur 110 mm.

Les grandes en bas de diamètre extérieur 130 mm.

Ce dispositif permet d'avoir un espace annulaire qui va en croissant vers le haut.

Si on a faire à un jus moussant, c'est à la partie supérieure que cette mousse se produit et est la plus abondante ; l'espace entre la colonne de verre et la colonne porte-godets est aussi assez grand pour éviter qu'une partie du jus aille sur la colonne de verre et échappe ainsi au chauffage.

D'autre part, cette forme se rapproche assez des courbes de désulfitation que nous avons vues. En effet, au fur et à mesure que le jus muté descend le long de l'appareil, il se désulfite, mais on sait que la vitesse de désulfitation va en diminuant, ce phénomène est compensé par l'augmentation de la surface de chauffe du haut vers le bas de la colonne.

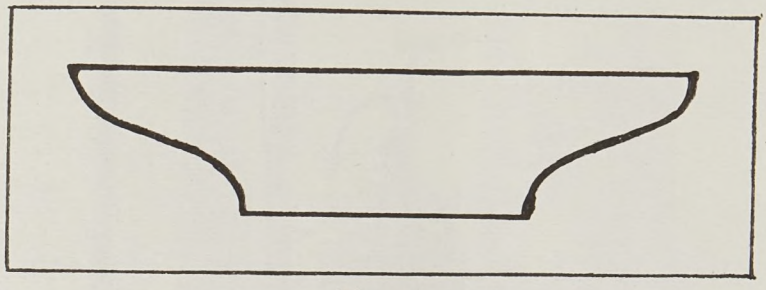


Fig. 6

A la partie inférieure l'appareil comporte un réchauffeur de jus qui utilise les calories provenant de l'eau condensée de la vapeur de chauffage.

Au bas de la colonne de verre se trouve le système d'embouteillage. Le réservoir a une capacité de 3 litres de façon à assurer un volant de travail.

Pour la mise en bouteille 2 robinets sont commandés par une seule poignée et l'ensemble est calculé de façon à vider la bouteille de son air avant d'y introduire le jus.

Le débit varie suivant la nature du jus muté de 30 à 60 l/heure avec des doses finales de SO_2 total inférieures à 50 mg/litre, de l'ordre de 10 à 20 mg en général pour des mutés de goutte classiques ayant un rapport S/A de 25 à 30.

Le temps de passage du jus muté dans la colonne de désulfitation, variable suivant la qualité du muté, est au maximum de 4 minutes.

Pour ce type d'appareil la pression qui permet d'avoir le meilleur équilibre calories transmises-température d'ébullition est celle de 50 cm de mercure, correspondant à une température d'ébullition de 89°5.

Il est, bien entendu, possible de travailler à une température plus

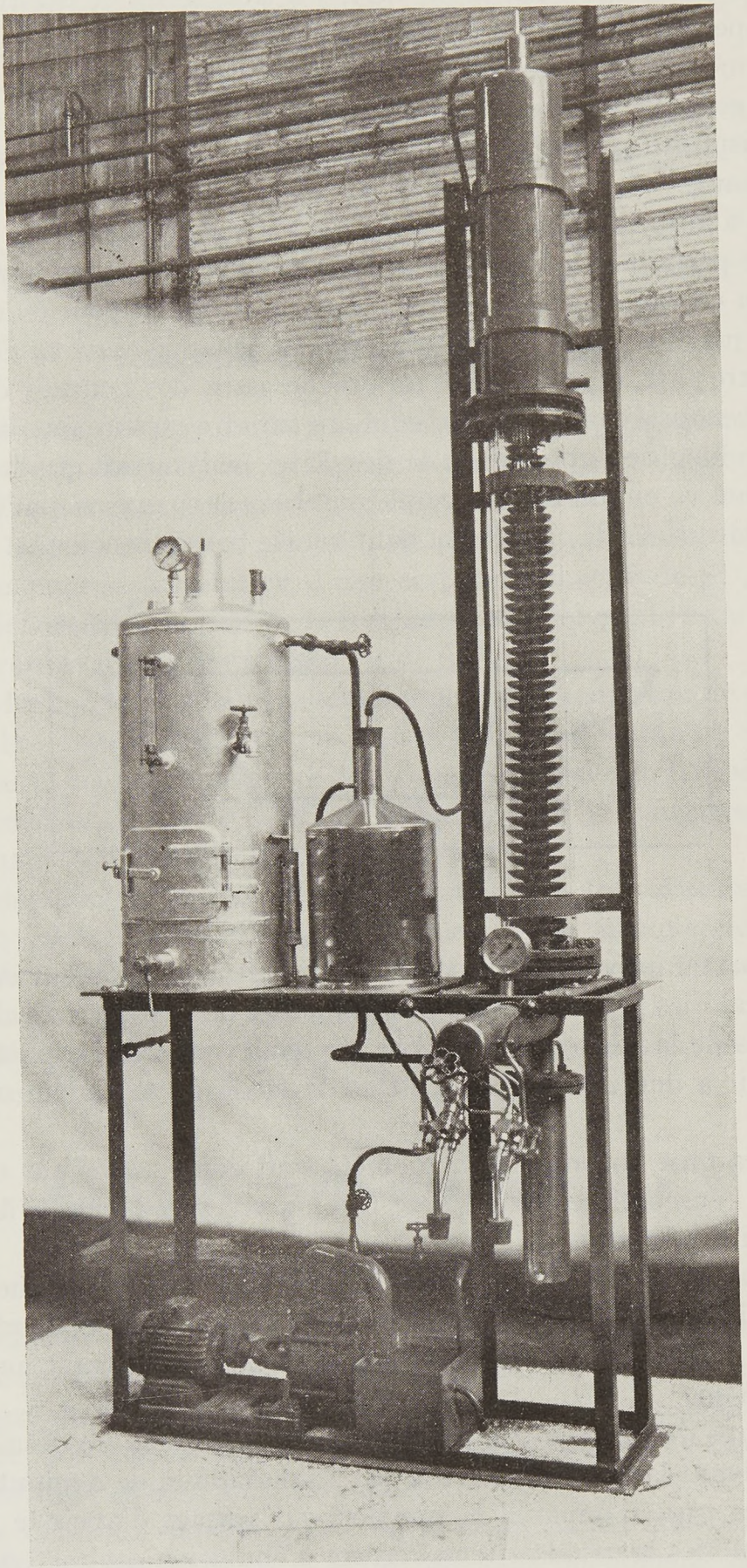


Photo 1

basse, en général on se fixe une valeur de pression comprise entre 25 et 30 cm de mercure. Celle-ci est valable pour les jus faciles à désulfiter.

A 30 cm de mercure, la température d'ébullition est de 87°. La température du jus à la sortie de l'appareil est de 77° ce qui est suffisant pour un *embouteillage. à chaud, sans pasteurisation.*

Les temps d'ébullition sont très réduits et en présence de SO_2 on évite ce que l'on appelle communément les « goûts de cuit ». Ces derniers d'ailleurs apparaissent au cours du vieillissement et sont dus le plus souvent à des phénomènes oxydatifs. Ceci se produit quel que soit le mode de stockage et de conditionnement. Ils montrent que l'on a intérêt à réduire le temps de conservation du jus conditionné.

Dans le *fonctionnement* de l'appareil on règle d'une part, l'arrivée du jus muté à l'aide d'une pince de Mohr, et d'autre part, l'arrivée de vapeur de façon à avoir un léger dégagement de vapeur extérieur.

On détermine la richesse du jus en SO_2 à la sortie de l'appareil. En fonction des résultats on modifie et débit et vapeur jusqu'à ce que le débit convenable soit établi. C'est alors que l'on doit considérer que le jus qui s'écoule est le jus désulfité.

La période de mise en route (chauffage de la chaudière compris) est de 15 à 30 minutes.

Appareil industriel

Il est représenté sur la photo (2). Son débit est de 400 à 600 litres-heure.

Cet appareil comporte, au centre, la colonne de désulfitation, surmontée d'un réfrigérant tronconique. A gauche, en bas, le barboteur à SO_2 est muni d'une pompe qui permet de faire circuler le lait de chaux à contre courant avec le SO_2. A l'intérieur, des anneaux de Raschig assurent une dispersion du lait de chaux.

Ce barboteur est refroidi par double fond et par un serpentin immergé dans le lait de chaux.

Une vanne électromagnétique permet de régler le vide à la valeur désirée, un système mécanique est prévu également en cas de panne.

A droite, en bas, la pompe à vide, qui est du type à anneaux de liquide, est surmontée d'un ballon d'une capacité telle, qu'en cas d'arrêt du moteur de la pompe, l'eau ne puisse pas remonter au-delà de ce ballon vers l'appareil.

La marche est identique à celle de l'appareil semi-industriel : une vanne pour l'arrivée du jus, une vanne pour la vapeur.

Le soutirage doit être effectué à l'aide d'une pompe, les calottes sont différentes de celles de l'appareil précédent. La *figure 7* représente la demi-élévation-coupe de 2 calottes successives.

Le tube porte-godets n'existe pas,ce sont les calottes elles-mêmes qui le forment.

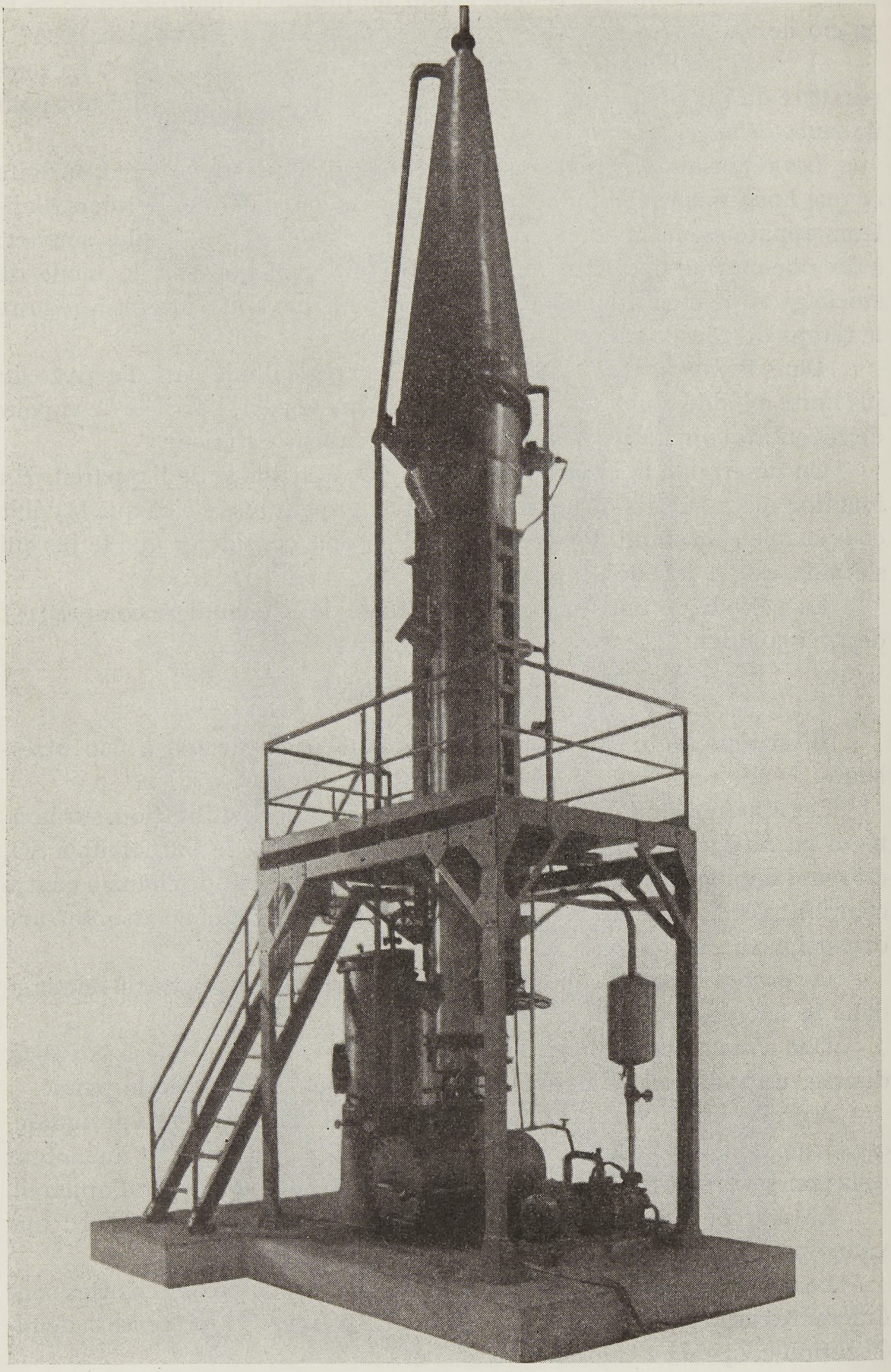


Photo. 2

Cet assemblage a permis d'augmenter la surface de chauffe et de diminuer la nappe de jus sur chaque calotte, on désulfite ainsi en des temps extrêmement courts.

Il n'a pas été possible pour des raisons de construction d'avoir 3 types de calottes comme sur l'appareil semi-industriel.

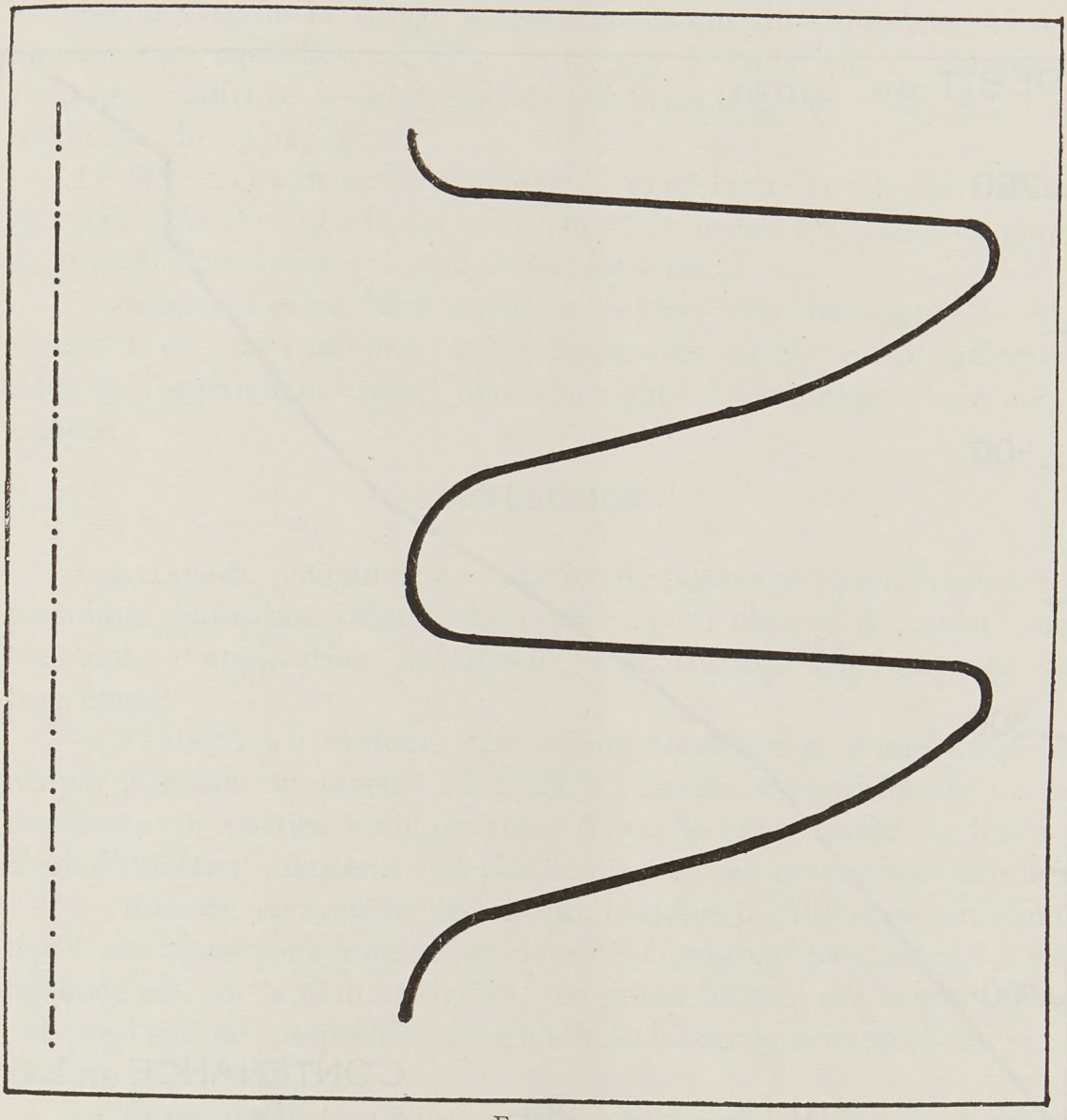


FIG. 7

La colonne extérieure est évasée en haut pour éviter l'inconvénient, déjà signalé, des jus moussants.

Un dispositif, non représenté sur la figure 7, permet de conserver dans l'appareil une contenance proportionnelle au débit comme le prouve la courbe de la *figure* 8.

Ceci est important et prouve que si l'on diminue le débit (dans le cas d'un muté difficile à désulfiter) la quantité de jus que contient l'appareil diminue, la surface étant invariable, c'est la hauteur de la couche qui

diminue, celle-ci est d'autant plus mince que le muté est difficile à désulfiter.

On a déjà vu l'influence de la hauteur de la couche. Avec ce dispositif on est assuré d'avoir une couche d'autant plus mince, donc d'autant plus facile à désulfiter, que le SO_2 est difficile à éliminer. La hauteur de la couche varie de 5 à 15 mm.

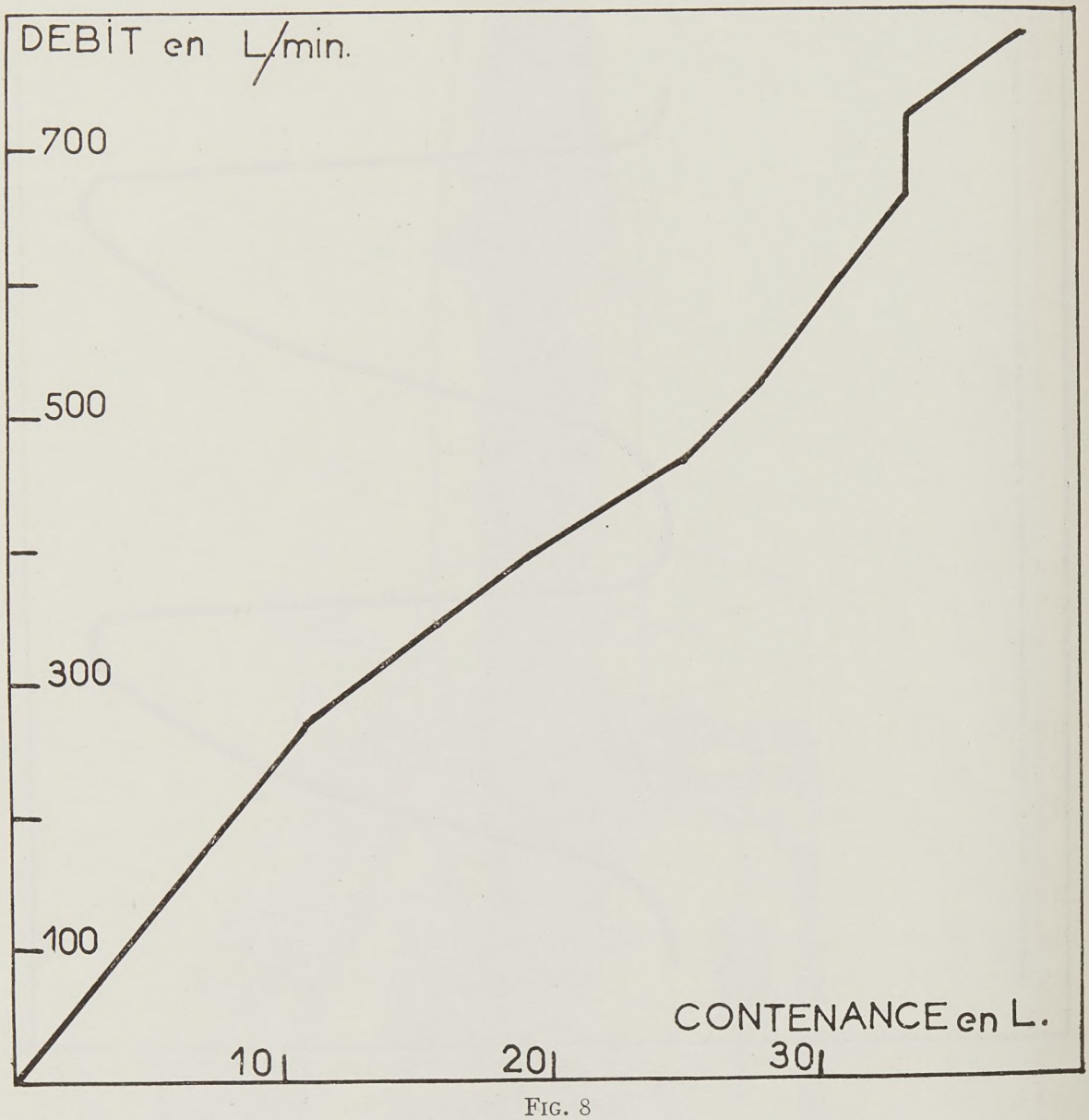


FIG. 8

D'autre part, la viscosité du muté augmentant au fur et à mesure de sa descente sur la colonne on est assuré qu'il est plus chauffé vers le bas où l'écoulement est plus lent, ce qui, étant donné l'allure des courbes de désulfitation, est souhaitable.

A cet appareil, un jus muté provenant du cépage «Aramon», contenant 940 mg de SO_2 total par litre, est passé à la cadence de 660 l/h, en donnant un jus ayant moins de 50 mg de SO_2 par litre. Signalons que ce muté était

vieux de plus d'un an, qu'il était par conséquent plus difficile à désulfiter qu'un jus de l'année.

L'appareil était chauffé avec une chaudière à haute pression, un détendeur permettant de régler la vapeur à la pression désirée dans les coupelles.

Le meilleur équilibre des températures pour un rendement maximum est obtenu avec de la vapeur à 150 g en amont du détendeur, c'est-à-dire dans les coupelles, un vide de 25 cm à l'intérieur de l'appareil. Dans ces conditions le débit était de 660 litres/heure avec un SO_2 total résiduaire de 13 mg-litre.

Le débit d'eau au condenseur était de 17 m³/heure, ce qui peut paraître excessif, mais alors que la densité du muté était de 1071,4, celle du jus est de 1070,8, c'est-à-dire que seul le SO_2 est éliminé.

Un appareil d'un débit supérieur — 1200-1800 litres/heure — est à l'étude. Il est constitué par 3 tubes de calottes, chacun étant analogue à celui de l'appareil industriel déjà vu, réunis à l'intérieur d'une même colonne.

CONCLUSION

Les travaux poursuivis à la Station de Narbonne depuis 1940 sur la technique Sulfitation-Désulfitation ont eu pour objectif d'aboutir à une technique d'application industrielle. Ces travaux sont jalonnés par trois étapes :

— D'abord, en système discontinu, désulfitation d'une masse de jus par injection de vapeur. Finalement l'eau de composition du jus est constituée en parties inappréciables d'eau de constitution (endogène), d'eau d'injection (exogène). En plus la plupart des arômes sont éliminés.

— Ensuite, en système discontinu, toujours désulfitation par ébullition d'une masse constante de jus, dans des conditions bien définies. Cette méthode est, sur le plan analytique, en grand progrès sur la précédente, puisque l'eau de composition est constituée intégralement par l'eau endogène.

— Enfin, réalisation d'un système continu, où la durée du chauffage est considérablement réduite, où tous les avantages de la technique précédente sont amplifiés et les désavantages supprimés.

Ces derniers résultats permettent de conclure que le principe de la technique sulfitation-désulfitation est valable aussi bien que les techniques habituellement utilisées et basées sur des facteurs physiques. Mais comme toutes les techniques elle est perfectible. Elle apparaît ainsi comme un procédé d'avenir pour le développement rationnel de l'industrie des jus de raisin.

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

(1) FLANZY (M.). — La désulfitation des jus de fruits. *Ind. Agric. et Alim.*, **66**, 31, 1944.
(2) FLANZY (M.). — Le problème du jus de raisin en France. *C. R. Ac. Agr. Fr.*, **41**, 89, 1955.
(3) SIMS. — *Annalen der Chemie*, **118**, 340, 1861.
(4) RIBEREAU-GAYON. — *Traité d'Œnologie*, 323.
(5) MAYNARD (Dr.) et JOSLYN (A.). — How do Cut down on SO_2 content. Wines et Vines, 1954.
(6) VAS (K.) et INGRAM (M.). — Preservation of fruit juices withless SO_2. *Food Mnufacture*, **24**, 414-416.
(7) MOREAU et VINET. — Contribution à l'étude de l'anhydride sulfureux en vinification. *Ann. Fals. Fraudes*, **20**, 316, **21**, 130, 1927.
(8) BRAVERMAN (J. B. S.). — Le mécanisme de l'action de l'anhydride sulfureux sur certains sucres. Conférence à la Commission scientifique et technique de la Fédération Internationale des producteurs de jus de fruits. Paris 23-24 mars 1953.
(9) GOHMANN (M.) et OSMAN (E. M.). — Sugar sulfite reaction and relationship to food problems. *Advances in food research*, V, 53, 11, 1954.
(10) BERG .— Binding of SO_2 by sugars. *Vinodélié i Vinogradarstvo* S. S. S. R., **6**, 15-18, 1946.
(11) STEPANENKO (B. N.) et SERDYUK (O. C.). — The contents of acyclic forms of various sugars in aqueous solutions. *Biokhimiya* S. S. S. R., **15**, 155.
(12) DEIBNER (L.) et BENARD (P.). — Recherches sur la séparation de l'acide acétaldéhyde sulfureux contenu dans les boissons alcooliques. *Ind. Agric. et Alim.*, 973-978, 1954, 13-18, 1955.
(13) JAULMES (P.). — Traité d'analyse des vins, 427.
(14) OURNAC (A.). — Migration de la Vitamine C et du facteur P des éléments solides du raisin dans les jus élaborés par le procédé sulfitation-macération-désulfitation. *Ann. Techn. Agric.* de l'I. N. R. A., 269-282, 1954.
(15) JOSLYN (M. A.) et PONTING (J. D.). — Enzyme catalyzed oxidation browning of fruit products. *Advances in Food research*, **3**, 1-44, 1951.
(16) JOSLYN (M. A.) et BRAVERMAN (J. B. S.). — Advances in food research, V, 97-147, 1954. The Chemistry and Technology of the pret reatment and preservation of fruit and vegetable Products with sulfur Dioxide and sulfites.
(17) NEGRE (E.), MARICHAL (M.) et AFFRE (J. P.). — Pour une amélioration de l'industrie du jus de raisin. *Annales de l'Ecole Nationale d'Agriculture de Montpellier*, t. XXVIII, 1-117, 1949.
(18) FLANZY (M.). — La désulfitation des vins et des jus de fruits. *Ind. Agric. et Alim.*, **66**, 31-44, 1949.
(19) NEGRE (E.). — Préparation des jus de raisin et des moûts concentrés par mutage et désulfitation. *Ind. Agric. et Alim.*, 37-43, 1950.
(20) BARRAL (F.). — La désulfitation des jus de raisin. *Revue Technique de l'industrie alimentaire*, IV, 30-35, 1957.
(21) SEITZ-WERKE. — Brevet français n° 1.099.368.
(22) BERTUZZI. — La desolforazione dei mosti muti. *Rivista di Viticultura et di Enologia*, Conegliano, **7**, 1955.
(23) I. N. R. A. — Brevet français n° 1.132.102.
(24) NEGRE (E.). — Nouvel appareil à désulfiter. *Chim. et Ind*, **80**, 716-719, 1958.

INFLUENCE DE LA RACE DES VACHES LAITIÈRES SUR LA COMPOSITION DE LA MATIÈRE GRASSE DU LAIT [1]

PAR

S. KUZDZAL-SAVOIE

Station centrale de recherches laitières, Jouy-en-Josas.
et de Technologie des produits animaux
avec la collaboration technique de **B. BENITEZ de LUGO**

I. — INTRODUCTION

Les quelques travaux étrangers (1, 2, 3) se rapportant à l'étude de l'influence de la race des vaches laitières sur la composition de la partie saponifiable de la matière grasse du lait ont été analysés dans une publication récente (4) dans laquelle nous avons présenté les résultats d'une expérimentation poursuivie à Echiré (Deux-Sèvres).

Au cours de cette expérimentation, nous avons comparé la composition de la matière grasse du lait produit, d'une part, par un troupeau de vaches de race Parthenaise et, d'autre part, par un troupeau de vaches de race Normande, vivant dans des conditions analogues. De plus, la qualité des beurres fabriqués à partir du lait produit par chaque troupeau (le troupeau Parthenais et le troupeau Normand), a été examinée.

Une seconde expérimentation a été poursuivie à Jouy-en-Josas au Centre National de Recherches Zootechniques et les résultats obtenus font l'objet du présent travail. Nous avons comparé la composition de la matière grasse du lait produit par des vaches appartenant à des races différentes : la race Normande, la race Française Frisonne Pie Noire et la race Pie Rouge de l'Est.

[1] Expérimentation conduite au Centre National de Recherches Zootechniques de Jouy-en-Josas (Seine & et Oise).

II. — MÉTHODE EXPÉRIMENTALE

A. — CONDITIONS GÉNÉRALES DE L'EXPÉRIMENTATION

a) Conditions de vie du cheptel bovin.

Au Centre National de Recherches Zootechniques, les conditions générales de vie du cheptel bovin sont identiques pour tous les animaux ; à une période de stabulation s'étendant de novembre à avril ou mai, succède une période de plein air avec pâturage sur les prairies du domaine. Une nourriture d'appoint est distribuée pendant l'été lorsque l'herbe se révèle insuffisante. L'alimentation d'hiver est à base de betteraves, de foin et d'ensilage. Les vaches laitières reçoivent, en outre, une quantité de concentré proprotionnelle à la quantité de lait qu'elles produisent. Des expériences d'alimentation peuvent avoir lieu pendant la période de stabulation. Elles ne s'appliquent cependant, à un moment donné, qu'à un nombre limité de vaches du troupeau, et ne comportent généralement que des modifications dans les proportions relatives des aliments distribués (betteraves, foin et ensilage).

b) Principe et conduite de l'expérimentation.

L'expérimentation comporte le prélèvement d'échantillons de laits individuels. Ces laits sont analysés séparément ou servent à la préparation des laits de mélange. Chaque lait de mélange correspond à une race de vaches laitières.

c) Durée de l'expérience.

Les prélèvements de lait ont été effectués d'avril 1955 à février 1956 (laits individuels analysés séparément) et de juillet 1955 à décembre 1956 (prélèvements destinés à la préparation des laits de mélange). Le schéma de la figure 1 indique les différentes périodes de prélèvements.

B. — ÉTUDE DES LAITS DE MÉLANGE

Les laits de mélange sont préparés à partir du lait produit par toutes les vaches en lactation à la date du prélèvement.

a) Caractéristiques des troupeaux.

1. — Nombre de vaches.

De juillet 1955 à décembre 1956, 32 vaches de race Frisonne Pie Noire, 31 vaches de race Normande et 5 vaches de race Pie Rouge de l'Est se sont trouvées en lactation.

Les dates de vêlage de toutes les vaches du troupeau s'étendent sur l'année entière. Le nombre réel de vaches en lactation au cours de l'expérimentation, calculé pour chaque mois, est donné dans le tableau I. On considère qu'une vache est en lactation pendant le mois au cours duquel a eu lieu le vêlage, si celui-ci se place pendant les 15 premiers jours du

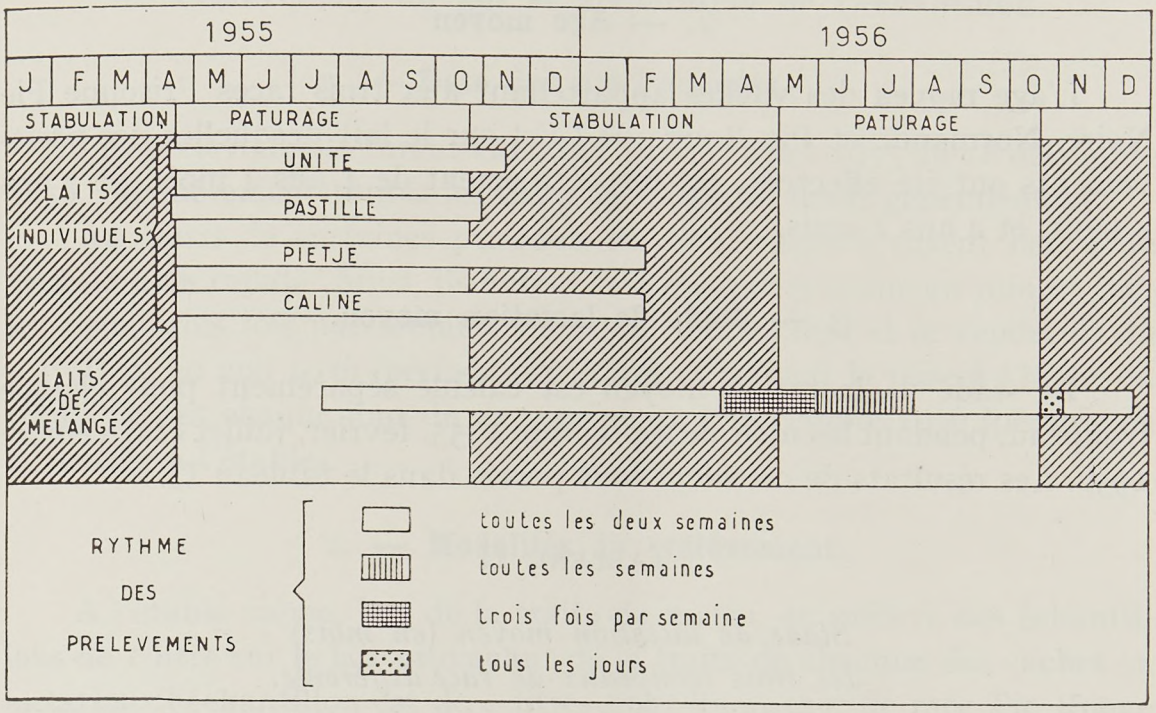


FIG. 1. — Schéma indiquant les différentes périodes de prélèvements.

mois. Si le vêlage a eu lieu après le 15e jour du mois, on considère que le premier mois de lactation se confond avec le mois suivant le mois du vêlage.

TABLEAU I

Nombre de vaches en lactation au cours de la période expérimentale.

1955

Races	Juillet	Août	Septembre	Octobre	Novembre	Décembre
Frisonne Pie Noire	18	18	16	12	14	16
Normande	14	15	15	14	17	19
Pie Rouge de l'Est	5	5	5	3	4	5

1956

Races	Janv.	Févr.	Mars	Avr.	Mai	Juin	Juil.	Août	Sept.	Oct.	Nov.	Déc.
Frisonne Pie Noire	17	16	19	20	24	25	25	25	23	20	21	18
Normande	19	19	19	21	19	17	15	15	12	11	17	16
Pie Rouge de l'Est ..	4	4	2	2	2	2	4	4	4	3	2	2

Le nombre de vaches en lactation appartenant à la race Pie Rouge de l'Est n'est que de deux en mars, avril, mai, novembre et décembre 1956. Ce point sera discuté au cours de la suite de l'exposé.

En ce qui concerne les deux autres races, on compte un nombre d'animaux qui est variable, mais reste voisin de 20.

2. — Age moyen

L'âge moyen des vaches appartenant aux trois races Frisonne Pie Noire, Normande et Pie Rouge de l'Est sur le lait desquelles des prélèvements ont été effectués, est respectivement de 4 ans 4 mois, de 3 ans 4 mois, et 4 ans 2 mois.

3 — Stade de lactation moyen.

Le stade de lactation moyen est calculé séparément pour chaque troupeau, pendant les mois de septembre 1955, février, juillet et décembre 1956. Les résultats de ce calcul sont portés dans le tableau II.

TABLEAU II

Stade de lactation moyen (en mois) des trois troupeaux de race différente.

Races	Septembre 1955	Février 1956	Juillet 1956	Décembre 1956
Frisonne	7,2	3,5	5,7	6,2
Normande	5,5	4,2	6,5	4,5
Pie Rouge	6,0	3,3	3,3	6,0

Le stade de lactation moyen de chaque troupeau pendant un mois déterminé de l'année, s'obtient en effectuant la moyenne arithmétique des stades de lactation « pondérés » de toutes les vaches du troupeau considéré.

Le coefficient de pondération est égal au rapport de la quantité de lait produit mensuellement par une vache déterminée à la quantité de lait produit pendant le même temps par l'ensemble du troupeau auquel elle appartient.

En février 1956, le stade de lactation moyen est bas pour les trois troupeaux. De nombreux vêlages ont lieu en effet vers la fin de l'hiver. Le stade de lactation moyen est également bas en juillet pour le troupeau de vaches de race Pie Rouge de l'Est. Nous avons, en effet, noté qu'en juillet 4 vaches Pie Rouge de l'Est se trouvent en lactation alors qu'il n'y en a que 2 en juin.

La différence séparant les stades de lactation moyens se rapportant aux troupeaux de race Frisonne Pie Noire et Normande peut atteindre un mois et demi (septembre 1955 et décembre 1956). Dans tous les cas, on se trouve toujours en deça du 8e mois de lactation.

b) Prélèvement du lait et préparation de l'échantillon.

1. — Date des prélèvements.

Les prélèvements furent effectués, du 19 juillet 1955 au 18 décembre 1956, régulièrement toutes les deux semaines, le lundi généralement.

Au cours de certaines périodes, les prélèvements eurent lieu à un rythme plus rapide. Ainsi, ils eurent lieu chaque semaine en juin et juillet 1956, trois fois par semaine (le lundi, le mercredi et le vendredi) du 4 avril au 30 mai 1956 (période précédant et suivant la mise à l'herbe du troupeau), et chaque jour du 22 octobre au 2 novembre 1956 (période de la rentrée à l'étable).

2. — Modalités du prélèvement.

A l'étable même, lors de la traite du matin, on prélève des échantillons de 1 litre sur le lait provenant de la traite de chacune des vaches en lactation (l'échantillon est de 2 litres pour les vaches de race Pie Rouge de l'Est lorsqu'on ne compte que 2 vaches de cette race en lactation).

Au laboratoire, on prélève sur chaque échantillon ramené de l'étable, un nouvel échantillon représentant un volume de lait proportionnel à la quantité de lait produit par chaque vache lors de la traite du matin. Ce volume est choisi de telle façon que le volume total des échantillons correspondant à l'ensemble des vaches appartenant à une même race soit de l'ordre de 4 à 5 litres.

3. — Préparation de l'échantillon de beurre.

Les trois laits de mélange correspondant aux trois races de vaches laitières sont écrémés séparément. Après un séjour d'une heure environ à la glacière (+ 4° C) la crème est transformée en beurre dans un appareil « Turmix ». Le beurre est lavé et malaxé.

4. — Analyse.

Le beurre est fondu à 60° C au bain-marie. La matière grasse est séparée par centrifugation.

Sur la matière grasse, on détermine l'indice d'iode suivant la méthode de Wijs, l'indice de saponification, et l'acidité volatile soluble et insoluble par le procédé officiel du Service de la Répression des Fraudes.

On note, lors de chaque analyse, la coloration relative de la matière grasse des trois échantillons de beurre correspondant chacun à une race de vaches laitières et provenant de prélèvements effectués le même jour.

C. — ETUDE DES LAITS INDIVIDUELS.

Parallèlement aux analyses effectuées sur des laits de mélange, des analyses semblables ont été effectuées sur 4 laits individuels.

a) Caractéristiques des vaches retenues pour cette étude.

Le tableau III résume les caractéristiques des 4 vaches retenues : deux vaches de race Frisonne Pie Noire, et deux vaches de race Normande. Les dates de vêlage d'Unité (Frisonne) et de Pastille (Normande) d'une part, de Pietje (Frisonne) et de Caline (Normande) d'autre part, sont très voisines.

TABLEAU III

Caractéristique des vaches dont le lait est prélevé et analysé séparément.

Nom	Race	Date de naissance	Date de vêlage	Date de tarissement
Unité (26 H)	Frisonne	3/2/51	12/2/55	23/11/55
Pastille (9 N)	Normande	24/1/50	20/2/55	2/12/55
Pietje (23 H)	Frisonne	26/1/50	15/4/55	3/2/56
Caline (11 N)	Normande	16/2/49	18/4/55	26/10/56

b) Modalités des prélèvements.

Les prélèvements ont été effectués toutes les deux semaines, du 15 avril 1955 au 14 et 18 novembre 1955 pour Unité et Pastille et du 22 avril 1955 au 10 février 1956 pour Pietje et Caline.

Sur le lait produit lors de la traite du matin pour chacune des quatre vaches retenues, on prélève quatre échantillons de 4 litres à partir desquels on prépare quatre échantillons de beurre, suivant la technique de fabrication du beurre déjà décrite pour les laits de mélange.

c) Analyse.

L'analyse comporte les mêmes déterminations que celles indiquées pour les échantillons de beurre fabriqués à partir de laits de mélange. Sur les échantillons de beurre fabriqués à partir des laits individuels d'avril à juillet 1955 on a, en outre, estimé le carotène.

Cette estimation est ainsi effectuée : après saponification de la matière grasse, la solution alcoolique de savon est amenée aux proportions de Lémeland (alcool 50 p. 100 et solution potassique 0,1 N). L'insaponifiable est extrait à l'éther de pétrole. Après évaporation du solvant, l'insaponifiable est repris par le chloroforme et amené à un volume déterminé. On mesure au moyen du colorimètre tricellule de JOBIN et YVON, avec l'écran 47, l'absorption de la solution chloroformique de l'insaponifiable. Une courbe d'étalonnage est établie à partir de solutions chloroformiques de carotène pur (HOFFMANN-LAROCHE) à des concentrations variables.

III. — RÉSULTATS

On étudie séparément les résultats des analyses effectuées sur les laits de mélange et les résultats des analyses effectuées sur les laits individuels.

A. — LAITS DE MELANGE

On a effectué des analyses :

a) toutes les deux semaines de juillet 1955 à décembre 1956 ;

b) trois fois par semaine en avril et mai 1956 ;

c) chaque jour du 22 octobre au 2 novembre 1956.

On présente séparément les résultats correspondant à chacune des trois series d'analyses.

a) Analyses effectuées toutes les deux semaines de juillet 1955 à décembre 1956.

Les résultats de ces analyses sont portés sur les figures 2, 3, 4 et 5.

Les différents indices de la matière grasse du lait suivent les variations saisonnières, identiques à celles que nous avons maintes fois observées dans les régions où un régime de stabulation succède à un régime de plein air (5,6). Les périodes de mise à l'air du troupeau et de rentrée à l'étable correspondent à de brusques modifications de ces indices. Pour chaque indice, les courbes se rapportant aux trois races de vaches laitières suivent le même mouvement général.

On a calculé d'une part, pendant la période de stabulation et, d'autre part, pendant la période de pâturage, les valeurs moyennes de l'indice d'iode, de l'indice de saponification et de l'acidité volatile soluble et insoluble de la matière grasse des laits de mélange provenant des trois groupes de vaches de races différentes : Frisonne Pie Noire, Normande et Pie Rouge de l'Est.

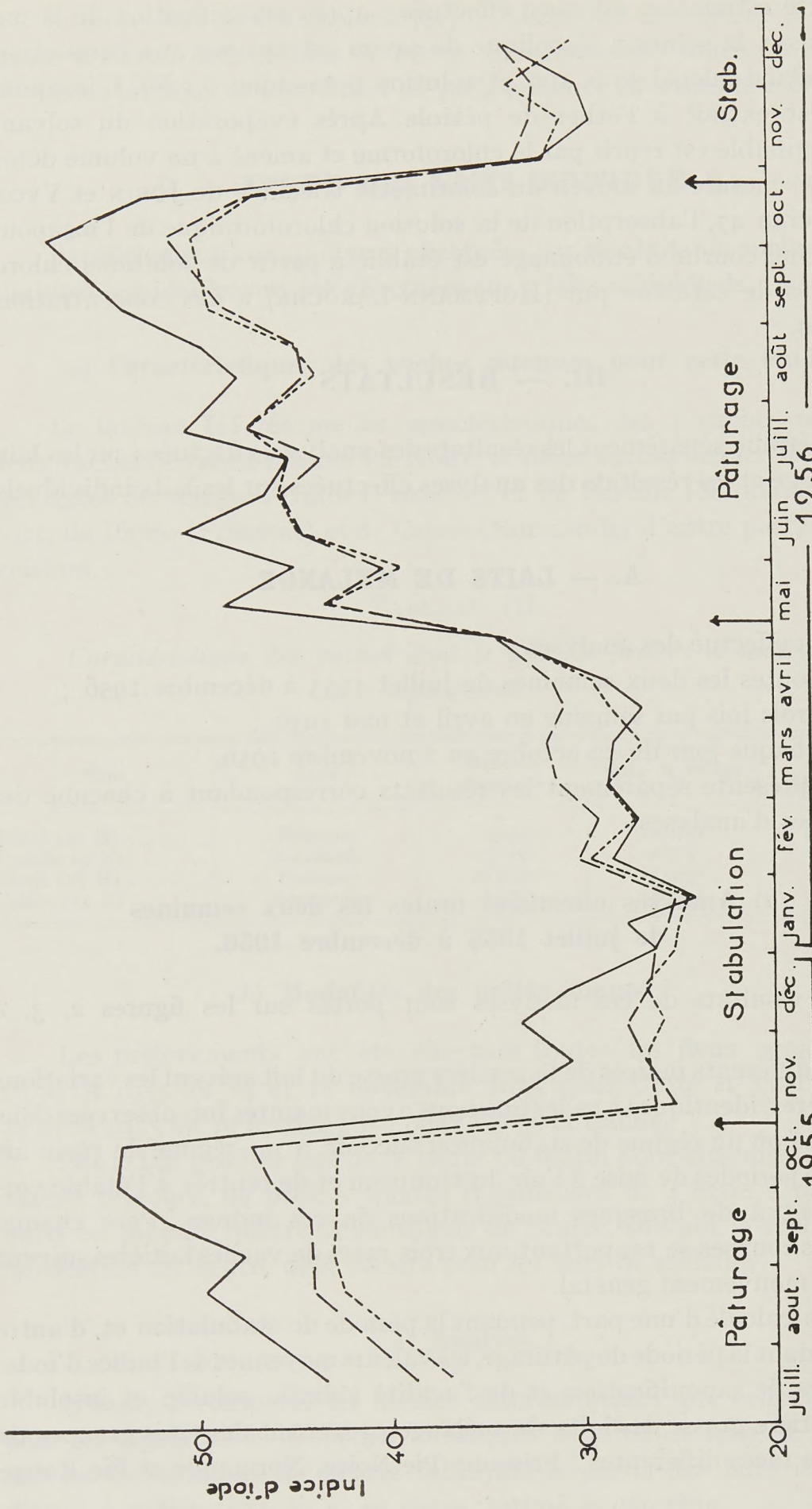


FIG. 2. — Variation de l'indice d'iode de la matière grasse des laits de mélange de juillet 1955 à décembre 1956.
——— race Pie Rouge de l'Est
— — — — race Frisonne Pie Noire
- - - - - - - - race Normande

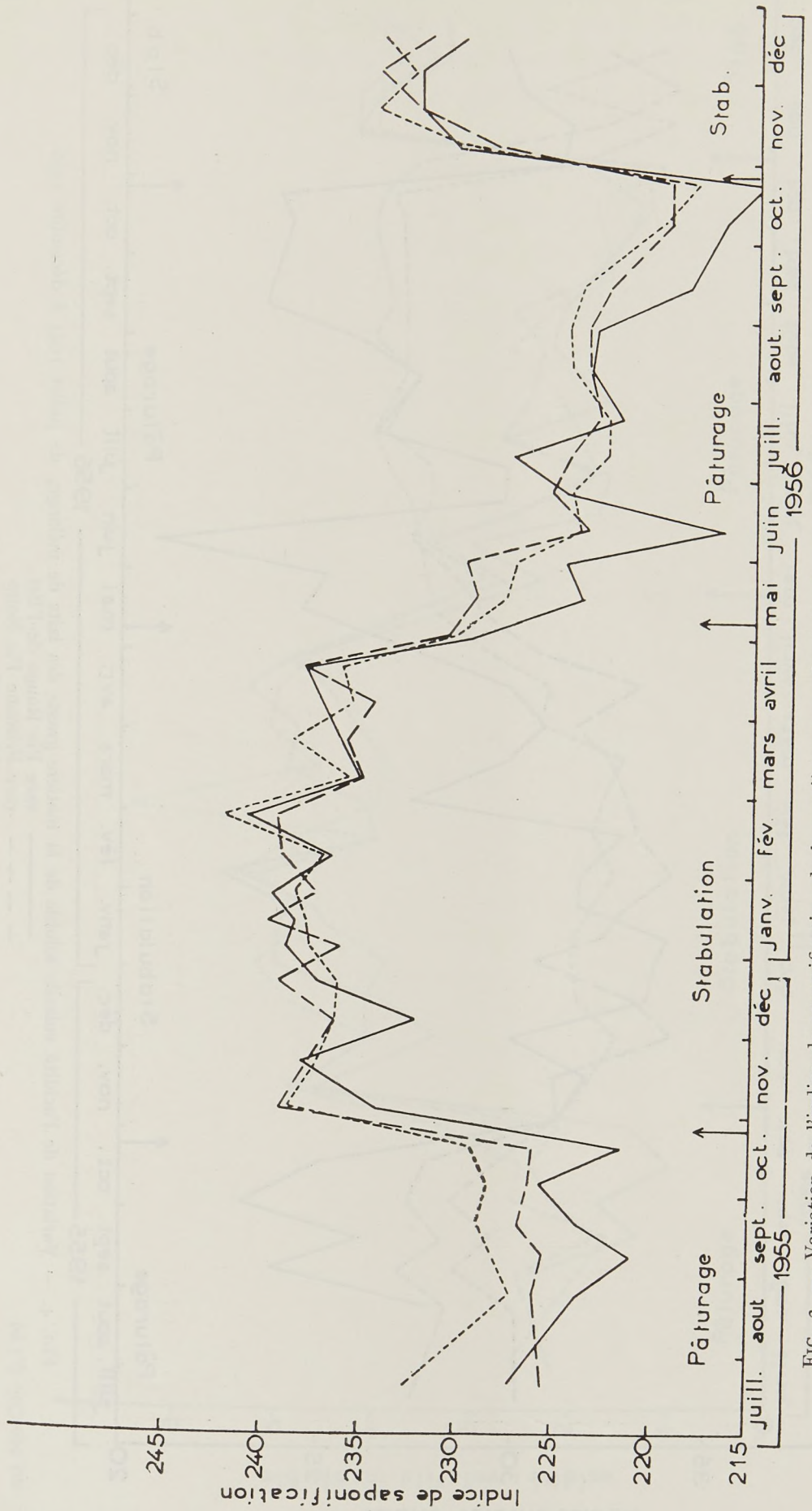


FIG. 3. — Variation de l'indice de saponification de la matière grasse des laits de mélange, de juillet 1955 à décembre 1956.
——— race Pie Rouge de l'Est
— — — race Frisonne Pie Noire
- - - - - - - race Normande

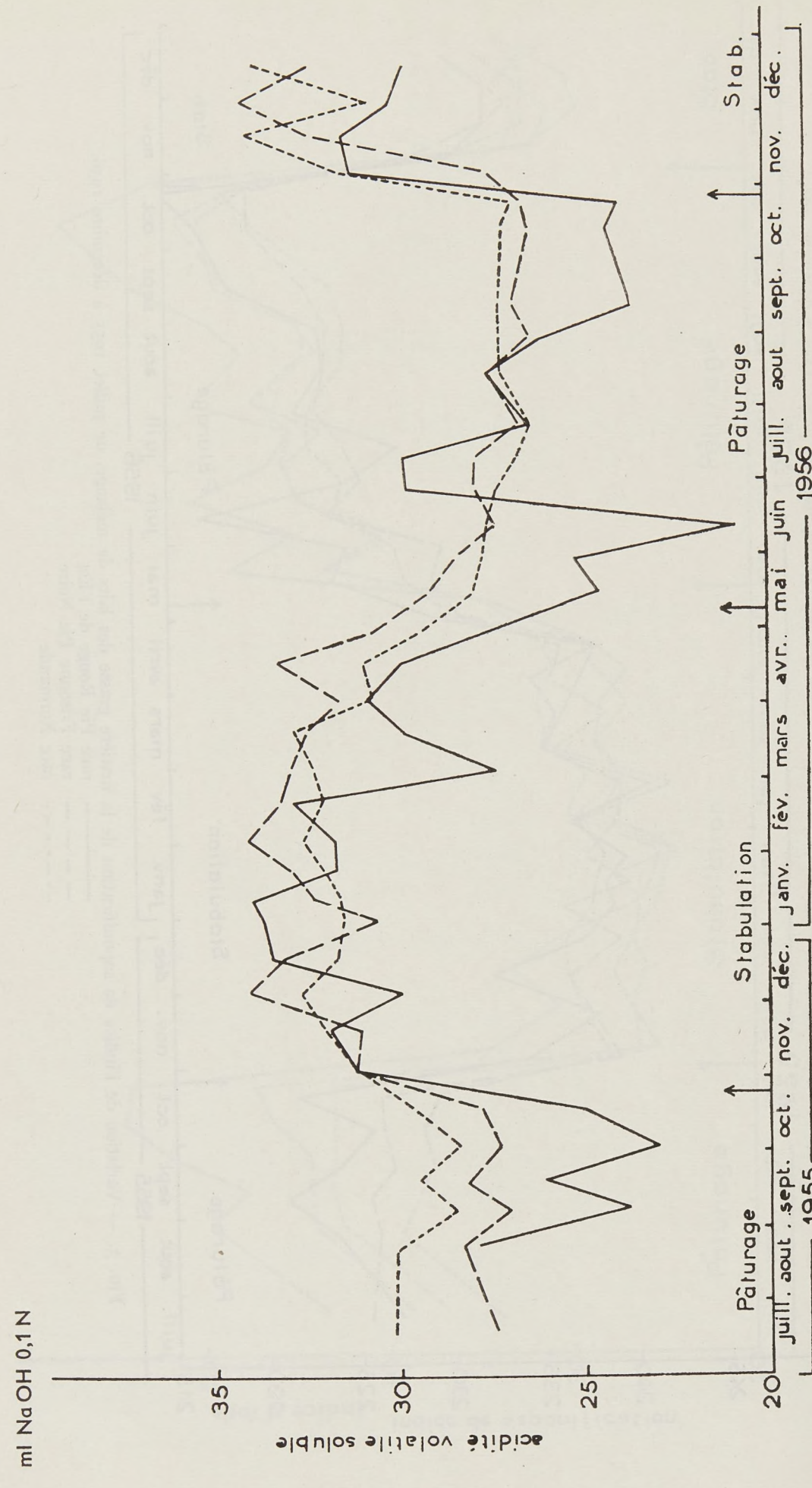


FIG. 4. — Variation de l'acidité volatile soluble de la matière grasse des laits de mélange, de juillet 1955 à décembre 1956.
——— race Pie Rouge de l'Est
– – – – race Frisonne Pie Noire
– – – – – – race Normande

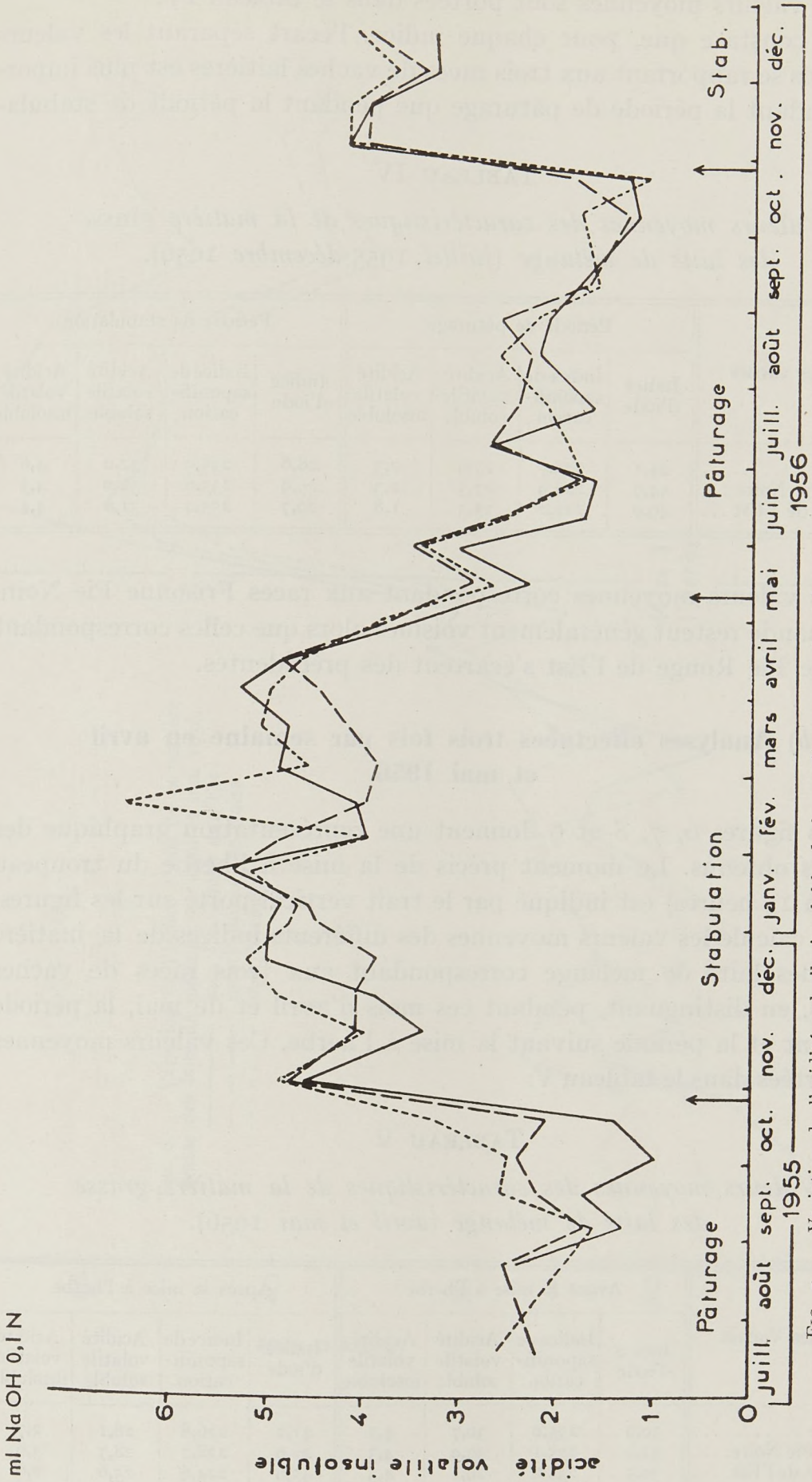


FIG. 5. — Variation de l'acidité volatile insoluble de la matière grasse des laits de mélange, de juillet 1955 à décembre 1956.
——— race Pie Rouge de l'Est
– – – – race Frisonne Pie Noire
race Normande

Ces valeurs moyennes sont portées dans le tableau IV.

On constate que, pour chaque indice, l'écart séparant les valeurs moyennes se rapportant aux trois races de vaches laitières est plus important pendant la période de pâturage que pendant la période de stabulation.

TABLEAU IV

Valeurs moyennes des caractéristiques de la matière grasse des laits de mélange (juillet 1955-décembre 1956).

Race des vaches	Période de pâturage				Période de stabulation			
	Indice d'iode	Indice de saponification	Acidité volatile soluble	Acidité volatile insoluble	Indice d'iode	Indice de saponification	Acidité volatile soluble	Acidité volatile insoluble
Normande	44,1	225,7	27,9	2,3	28,6	235,9	32,0	4,6
Frisonne Pie Noire ...	44,9	224,9	27,5	2,3	29,9	235,6	32,0	4,3
Pie Rouge de l'Est ...	49,9	222,2	25,3	1,8	29,7	235,4	31,0	4,4

Les valeurs moyennes correspondant aux races Frisonne Pie Noire et Normande restent généralement voisines alors que celles correspondant à la race Pie Rouge de l'Est s'écartent des précédentes.

b) Analyses effectuées trois fois par semaine en avril et mai 1956.

Les figures 6, 7, 8 et 9 donnent une représentation graphique des résultats obtenus. Le moment précis de la mise à l'herbe du troupeau (5 mai à 15 heures) est indiqué par le trait vertical porté sur les figures.

On calcule les valeurs moyennes des différents indices de la matière grasse des laits de mélange correspondant aux trois races de vaches laitières, en distinguant, pendant ces mois d'avril et de mai, la période précédant et la période suivant la mise à l'herbe. Ces valeurs moyennes sont portées dans le tableau V.

TABLEAU V

Valeurs moyennes des caractéristiques de la matière grasse des laits de mélange (avril et mai 1956).

Race des Vaches	Avant la mise à l'herbe				Après la mise à l'herbe			
	Indice d'iode	Indice de saponification	Acidité volatile soluble	Acidité volatile insoluble	Indice d'iode	Indice de saponification	Acidité volatile soluble	Acidité volatile insoluble
Normande	30,9	235,0	30,7	4,3	41,2	226,8	28,1	2,7
Frisonne Pie Noire....	32,9	235,1	32,0	4,3	42,0	228,2	28,7	3,0
Pie Rouge de l'Est....	30,5	234,6	29,1	4,3	45,6	224,6	25,6	2,6

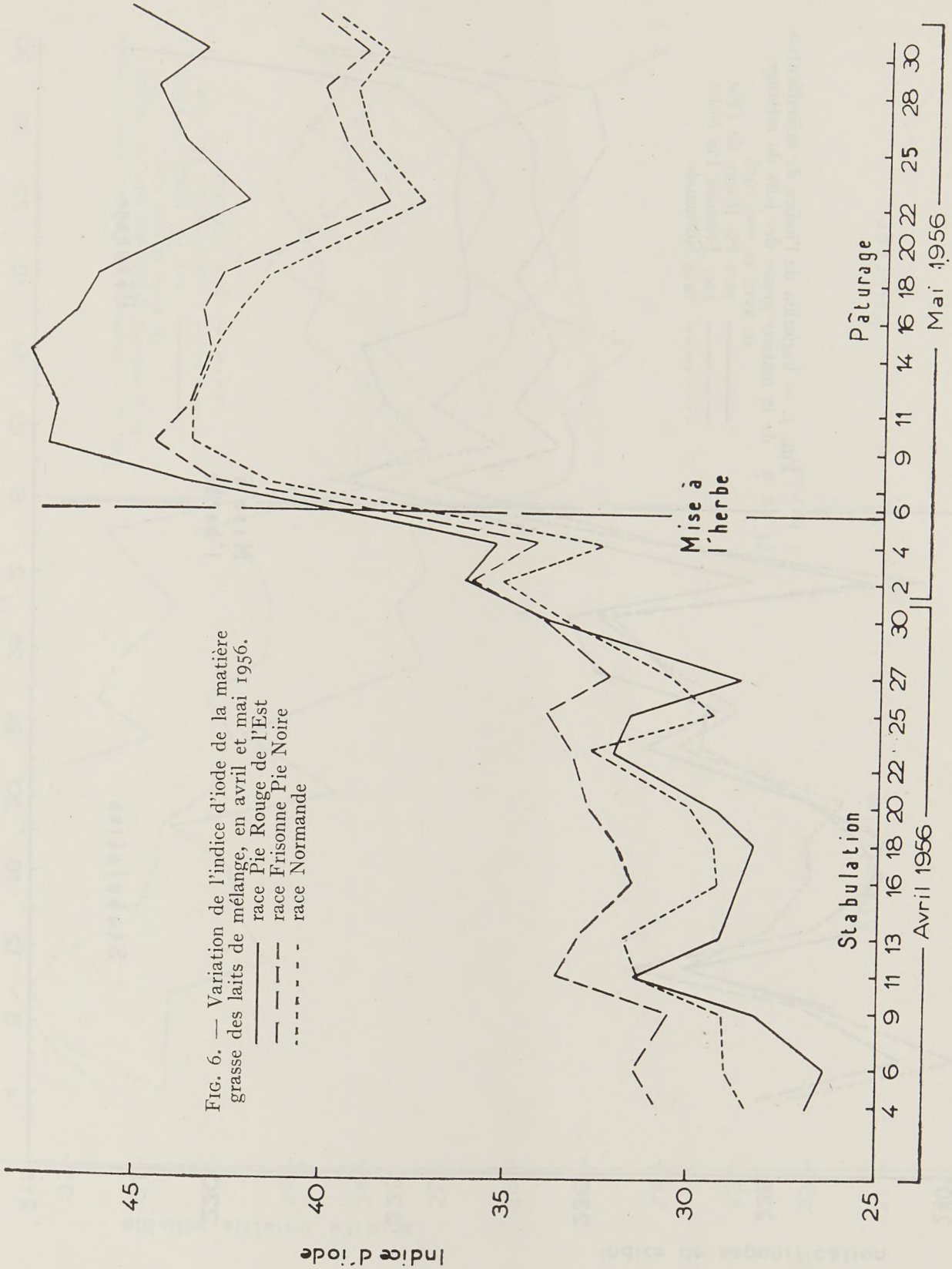


FIG. 6. — Variation de l'indice d'iode de la matière grasse des laits de mélange, en avril et mai 1956.
——— race Pie Rouge de l'Est
— — — — race Frisonne Pie Noire
- - - - - - race Normande

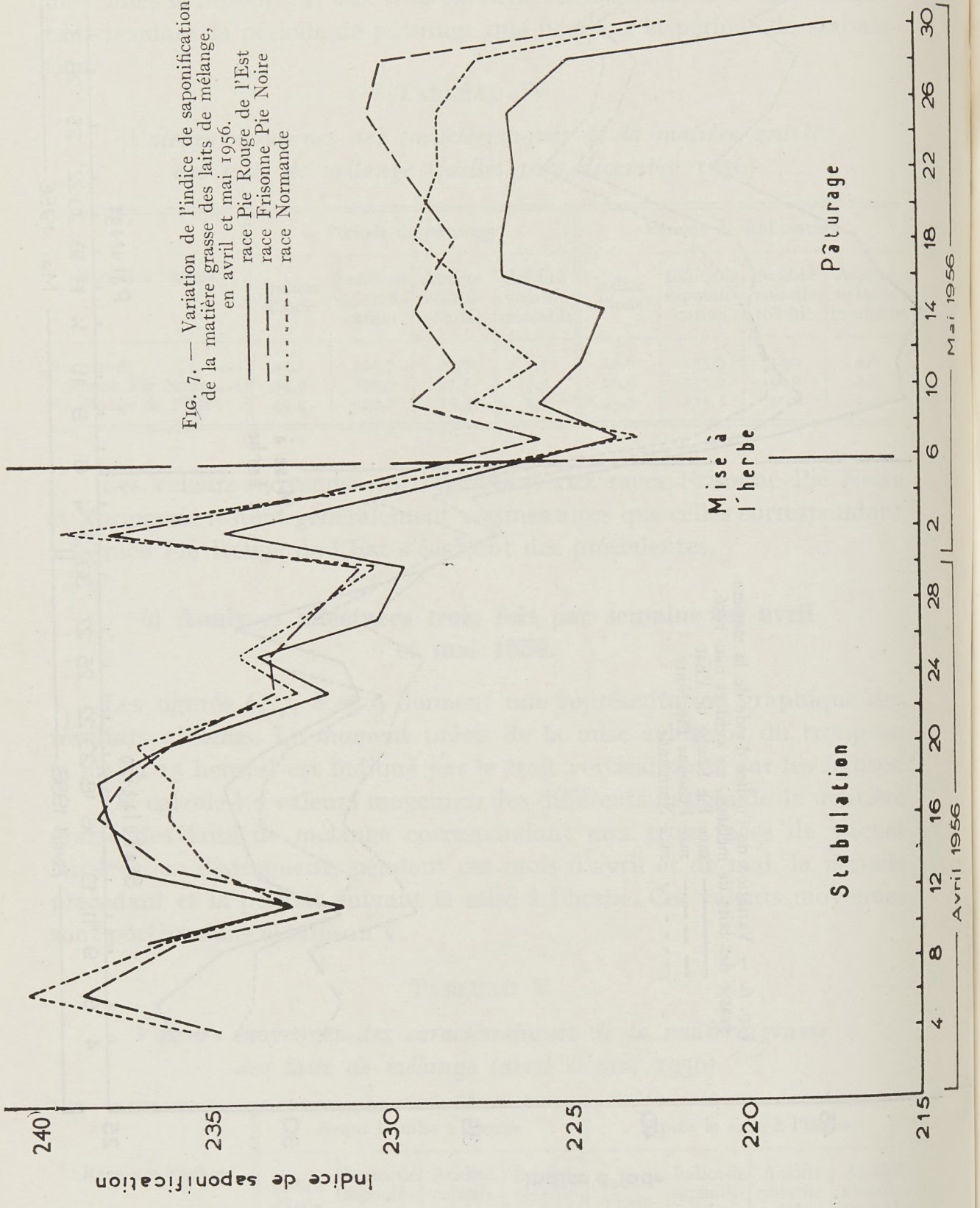


FIG. 7. — Variation de l'indice de saponification de la matière grasse des laits de mélange, en avril et mai 1956.
——— race Pie Rouge de l'Est
— — — — race Frisonne Pie Noire
. . . . . race Normande

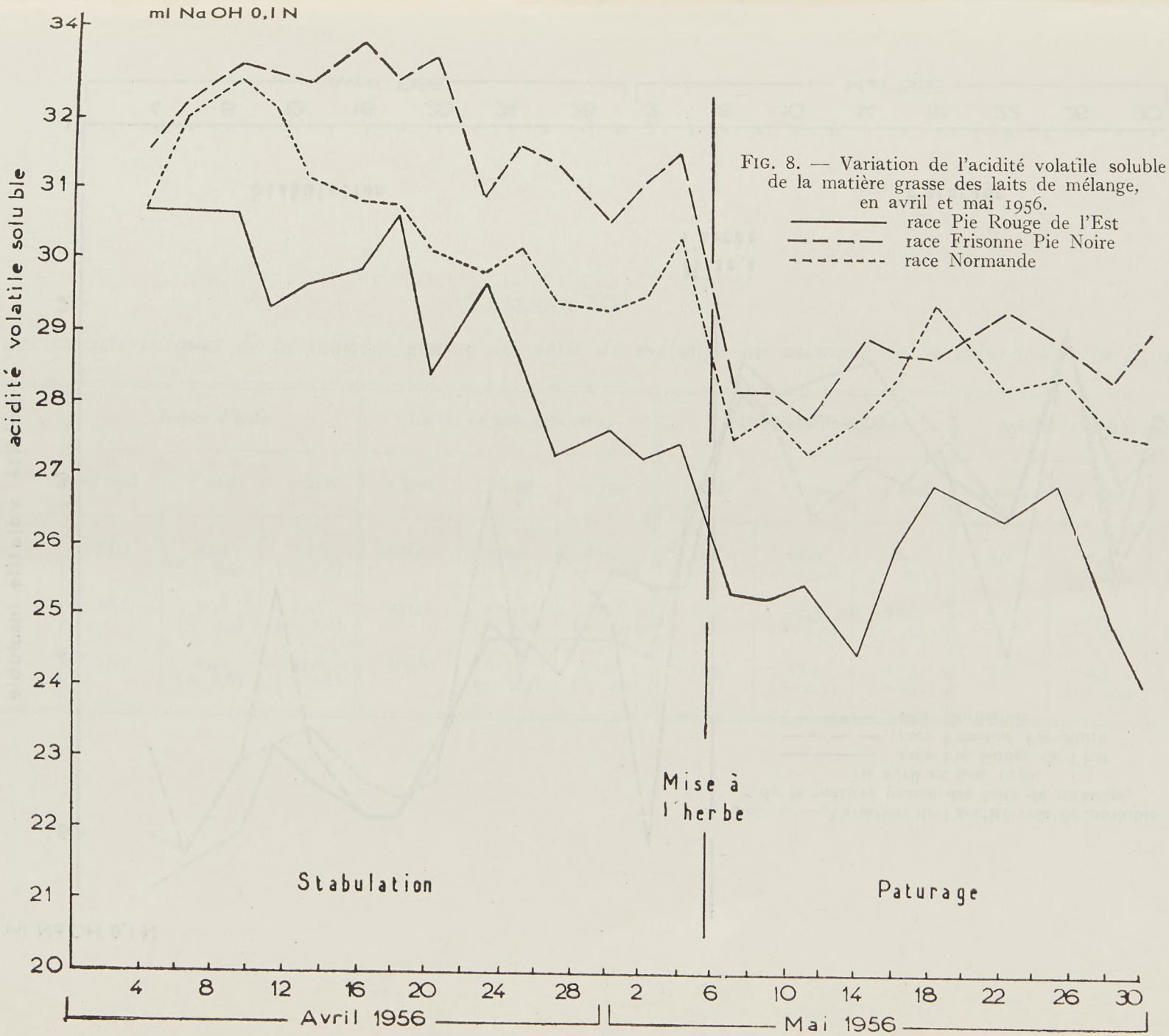


FIG. 8. — Variation de l'acidité volatile soluble de la matière grasse des laits de mélange, en avril et mai 1956.
race Pie Rouge de l'Est
race Frisonne Pie Noire
race Normande

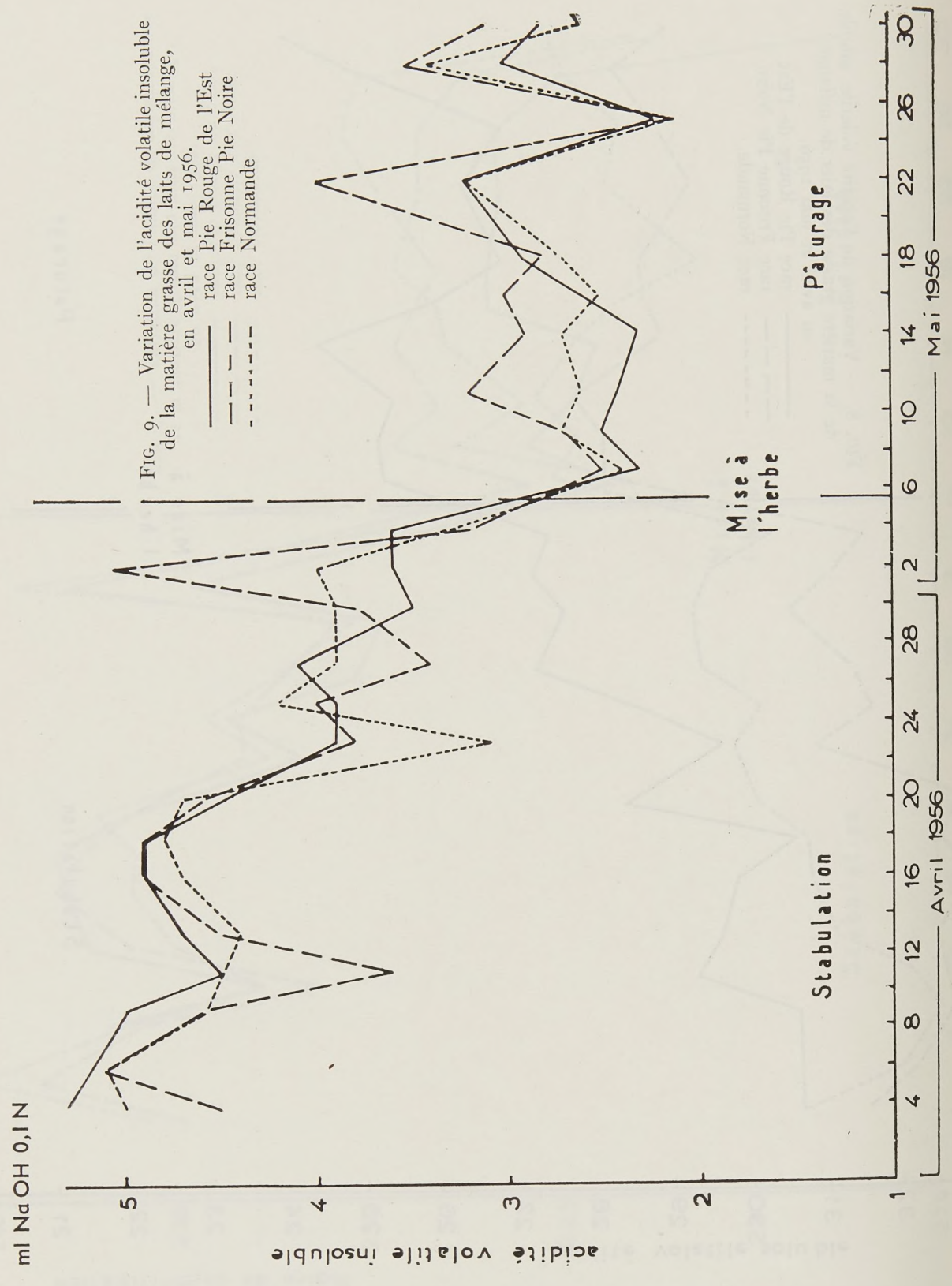


FIG. 9. — Variation de l'acidité volatile insoluble de la matière grasse des laits de mélange, en avril et mai 1956.
——— race Pie Rouge de l'Est
— — — race Frisonne Pie Noire
- - - - - - race Normande

TABLEAU VI

Variations des caractéristiques de la matière grasse des laits de mélange au moment de la mise à l'herbe (5 mai).

Race des vaches	Indice d'iode			Indice de saponification			Acidité volatile soluble			Acidité volatile insoluble		
	4 mai	7 mai	9 mai	4 mai	7 mai	9 mai	4 mai	7 mai	9 mai	4 mai	7 mai	9 mai
Frisonne Pie Noire	34,3	43,2 (+ 8,9)	44,8 (+ 1,6)	231,9	225,7 (— 6,2)	229,3 (+ 3,6)	31,7	28,3 (— 3,4)	28,2 (— 0,1)	3,2	2,5 (— 0,7)	2,7 (+ 0,2)
Normande.....	32,5	41,8 (+ 9,3)	43,8 (+ 2,0)	231,5	222,9 (— 8,6)	227,6 (+ 4,7)	30,4	27,5 (— 2,9)	27,9 (+ 0,4)	3,3	2,4 (— 0,9)	2,7 (+ 0,3)
Pie Rouge de l'Est	35,4	44,0 (+ 8,6)	47,8 (+ 3,8)	229,8	223,5 (— 6,3)	225,7 (+ 2,2)	27,5	25,4 (— 2,1)	25,3 (— 0,1)	3,6	2,3 (— 1,3)	2,5 (+ 0,2)

Ici encore, l'écart entre les indices d'iode d'une part, entre les indices de saponification d'autre part, est plus grand pendant la période qui suit la mise à l'herbe que pendant la période qui la précède. Toutefois, en ce

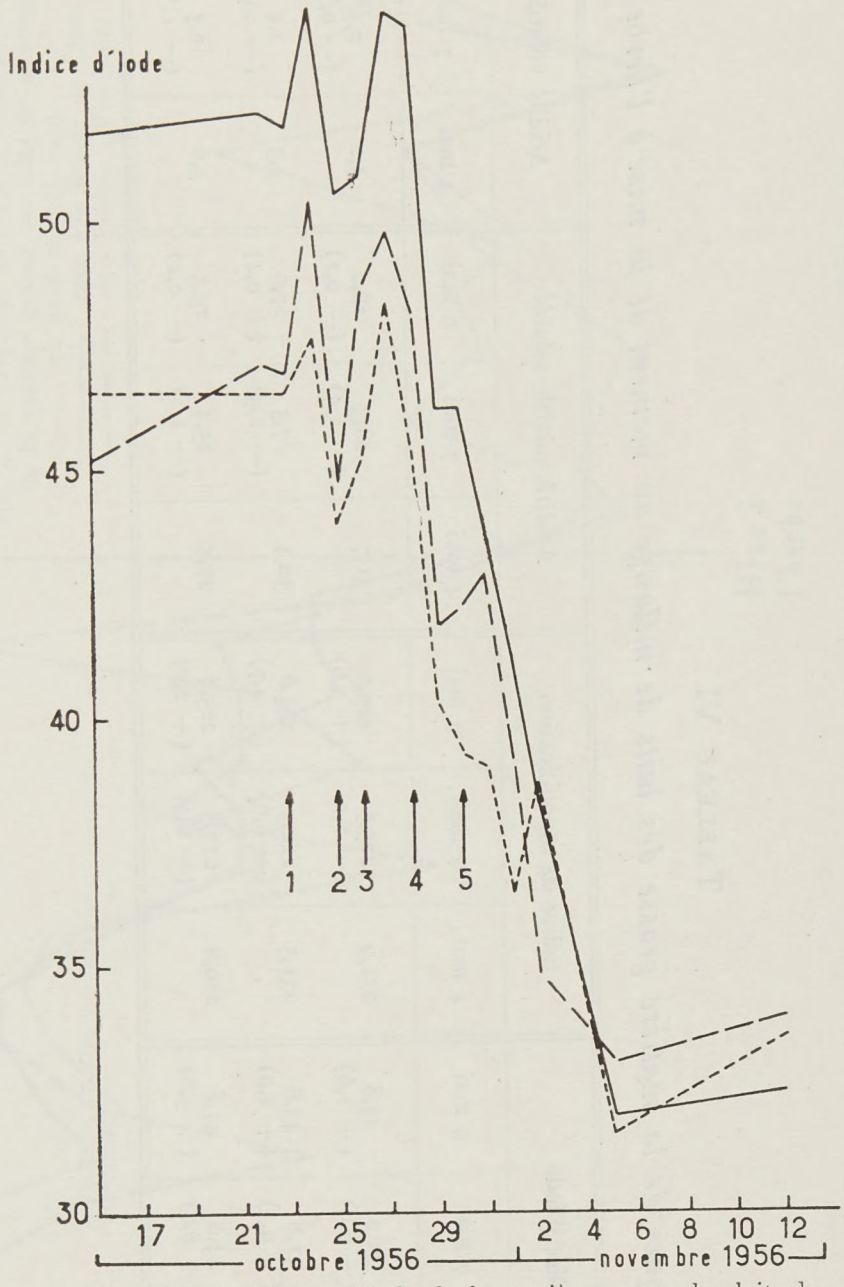


FIG. 10. — Variation de l'indice d'iode de la matière grasse des laits de mélange pendant la période de rentrée à l'étable.
——— race Pie Rouge de l'Est
— — — — race Frisonne Pie Noire
- - - - - - - race Normande

qui concerne l'acidité volatile soluble, on note un écart plus faible entre les valeurs se rapportant aux races Normande et Frisonne Pie Noire après la mise à l'herbe qu'avant la mise à l'herbe.

Si l'on considère la race Pie Rouge de l'Est par rapport aux deux autres races, on note que l'écart séparant les valeurs de l'acidité volatile soluble augmente au contraire après la mise à l'herbe.

Les résultats des analyses effectuées sur les échantillons de laits de mélange des 4, 7 et 9 mai portés sur le tableau VI mettent en évidence le sens et l'importance des variations des indices étudiés. L'augmentation de l'indice d'iode de la matière grasse du lait consécutive à la mise à l'herbe du troupeau se poursuit jusqu'au 9 mai. Au contraire, à la diminu-

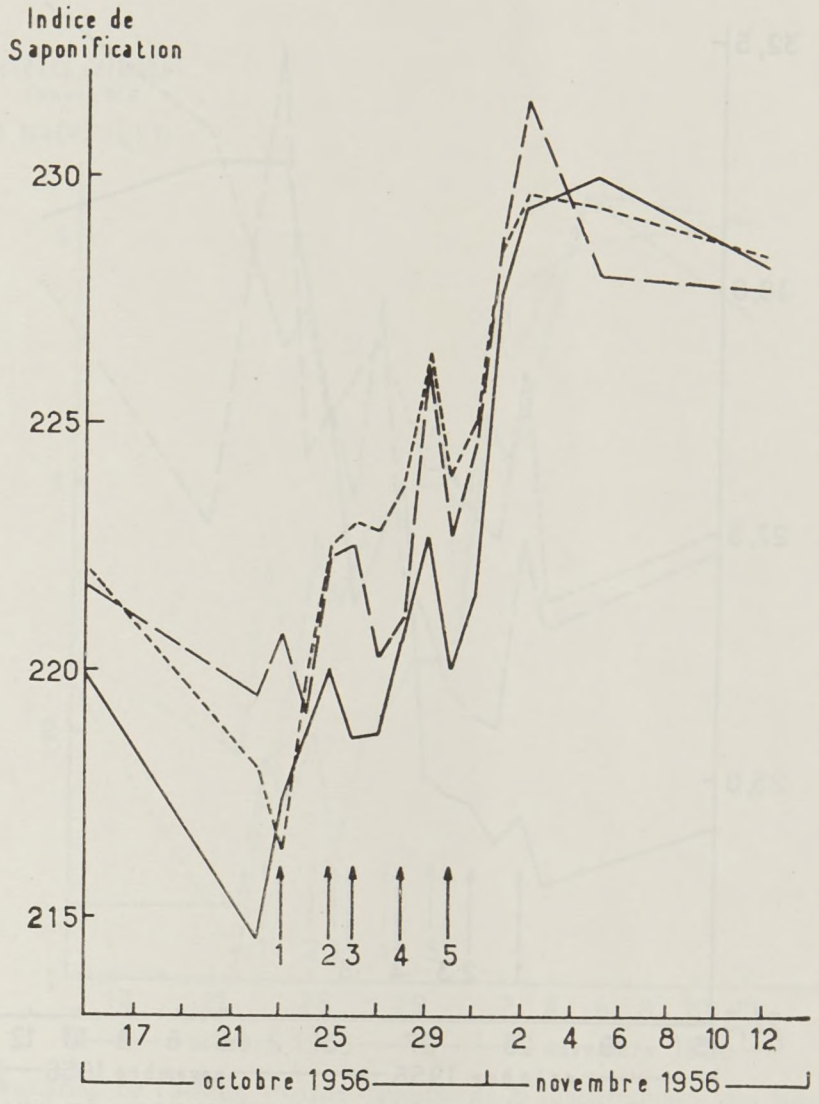


FIG. 11. — Variation de l'indice de saponification de la matière grasse des laits de mélange, pendant la période de rentrée à l'étable.
——— race Pie Rouge de l'Est
— — — race Frisonne Pie Noire
------- race Normande

tion de l'indice de saponification et de l'acidité volatile soluble et insoluble observée lors du prélèvement du 7 mai, après la mise à l'herbe du troupeau. succède dès le 9 mai, une augmentation de l'indice de saponification et de l'acidité volatile insoluble ; l'acidité volatile soluble reste stable du 7 au 9 mai.

Toutefois, durant toute la période de pâturage et malgré de nombreuses variations mineures, les indices varient dans le même sens qu'au cours des 48 heures qui ont suivi immédiatement la mise à l'herbe. Ainsi

les valeurs maxima de l'indice d'iode et les valeurs minina de l'indice de saponification et de l'acidité volatile s'observent pendant la période précédant immédiatement la rentrée à l'étable du troupeau.

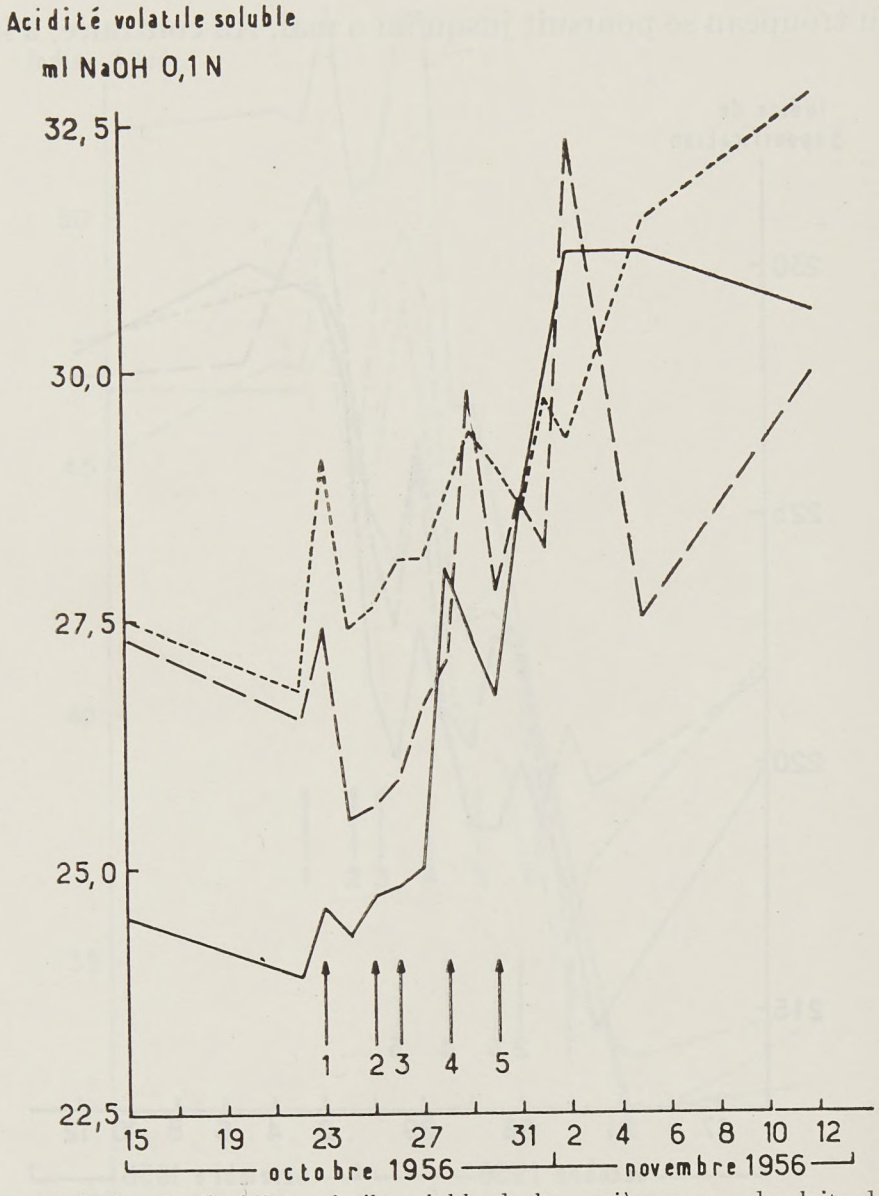


FIG. 12. — Variation de l'acidité volatile soluble de la matière grasse des laits de mélange, pendant la période de rentrée à l'étable.
——— race Pie Rouge de l'Est
— — — race Frisonne Pie Noire
- - - - - - race Normande

c) Résultats des analyses effectuées pendant la période de rentrée à l'étable.

Les résultats des analyses effectuées sur les échantillons de laits de mélange prélevés du 22 octobre au 12 novembre 1956, sont portés sur les figures 10, 11, 12, et 13.

L'établissement du régime hivernal a été obtenu en 1956 par paliers successifs qui correspondent aux index 1, 2, 3, 4 et 5 portés sur les figures 9 à 12.

Index 1 : les vaches en lactation rentrent à l'étable la nuit et sortent en pâture le jour ; on leur distribue à l'étable une ration de fourrage vert.

Index 2 : début de la distribution d'ensilage.

Index 3 : début de la distribution de betteraves (4 kg par jour et augmentation de 2 kg par jour).

Index 4 : suppression de l'alimentation en fourrage vert.

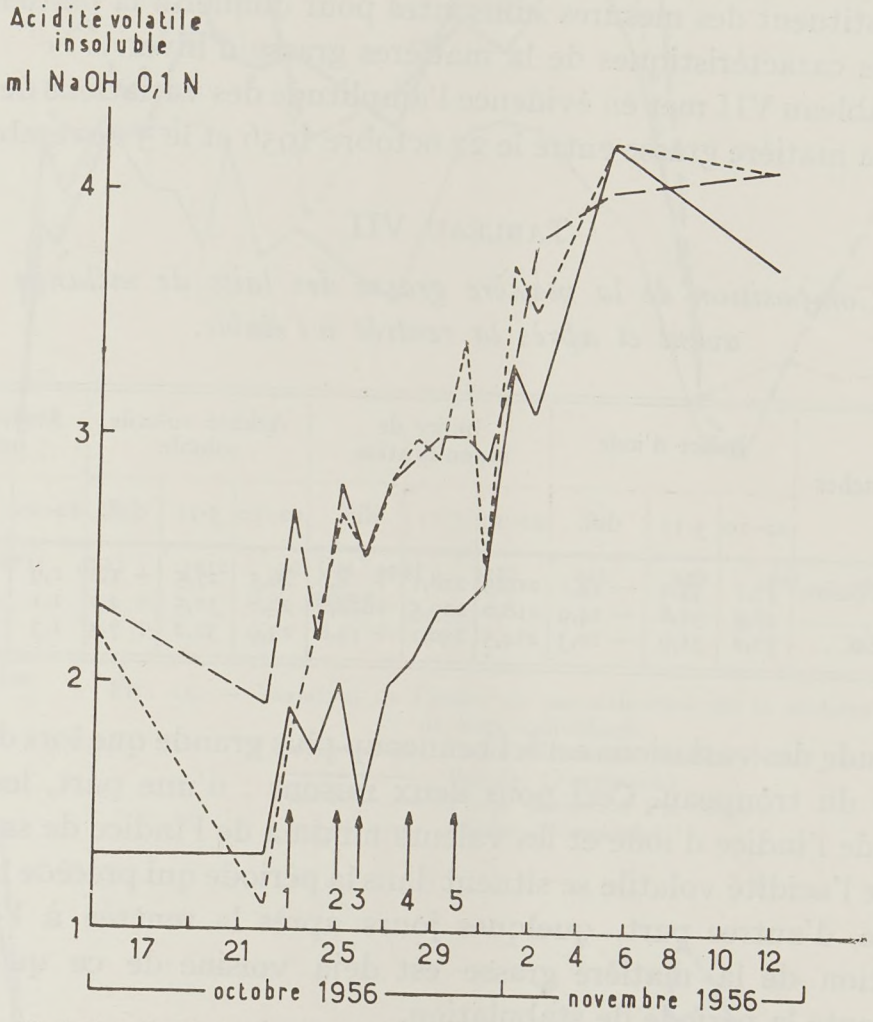


FIG. 13. — Variation de l'acidité volatile insoluble de la matière grasse des laits de mélange, pendant la période de rentrée à l'étable.
——— race Pie Rouge de l'Est
— — — race Frisonne Pie Noire
- - - - - - - race Normande.

Index 5 : suppression de la pâture.

On observe sur les figures 10 à 13 que les changements de composition de la matière grasse des laits de mélange se produisent de façon comparable pour les 3 races de vaches laitières. Le parallélisme est particulièrement net pour les indices d'iode et de saponification. Il s'observe encore entre les races Normande et Frisonne Pie Noire en ce qui concerne l'acidité volatile insoluble. Les résultats concernant l'acidité volatile soluble sont plus dispersés.

On note que la composition de la matière grasse varie du 22 octobre au 12 novembre par paliers successifs. Il n'est cependant pas possible de lier ces paliers successifs aux modifications du régime alimentaire ou des conditions de vie des vaches laitières que nous avons décrites plus haut (index 1 à 5).

Cependant, la suppression totale de la pâture ou de l'alimentation en fourrage vert, jointe à la distribution journalière de 20 kg de betteraves constituent des mesures suffisantes pour donner à la matière grasse du lait, les caractéristiques de la matières grasse d'hiver.

Le tableau VII met en évidence l'amplitude des variations de composition de la matière grasse entre le 22 octobre 1956 et le 5 novembre 1956.

TABLEAU VII

Composition de la matière grasse des laits de mélange avant et après la rentrée à l'étable.

Race des vaches	Indice d'iode			Indice de saponification			Acidité volatile soluble			Acidité volatile insoluble		
	22–10	5-11	diff.	22–10	5-11	diff.	22–10	5-11	diff.	22–10	5-11	diff.
Frisonne Pie Noire.	47,1	33,0	— 14,1	219,5	228,1	+ 8,6	26,5	27,5	+ 1,0	1,9	4,0	+ 2,1
Normande.....	46,5	31,6	— 14,9	218,0	229,5	+ 11,5	26,8	31,5	+ 4,7	1,1	4,2	+ 3,1
Pie Rouge Est....	52,2	31,9	— 20,3	214,5	230,1	+ 15,6	23,9	31,2	+ 7,3	1,3	4,1	+ 2,9

L'amplitude des variations est ici beaucoup plus grande que lors de la mise à l'herbe du troupeau. Ceci pour deux raisons : d'une part, les valeurs maxima de l'indice d'iode et les valeurs minima de l'indice de saponification et de l'acidité volatile se situent dans la période qui précède la rentrée à l'étable, d'autres part, quelques jours après la rentrée à l'étable la composition de la matière grasse est déjà voisine de ce qu'elle sera durant toute la période de stabulation.

B. — LAITS INDIVIDUELS.

Les figures 14, 15, 16 et 17 montrent les variations de composition de la matière grasse de laits individuels au cours, soit d'une lactation entière (cas de Pietje, vache de race Frisonne Pie Noire) soit d'une partie seulement d'une lactation, c'est-à-dire à l'exception des deux premiers mois (cas d'Unité, vache Frisonne Pie Noire et de Pastille, vache de race Normande).

En ce qui concerne Caline, vache de race Normande, la lactation commencée après le vêlage du 18 avril 1955 ne se termine que fin octobre 1956, de sorte qu'en février 1956, à la date du tarissement de Pietje,

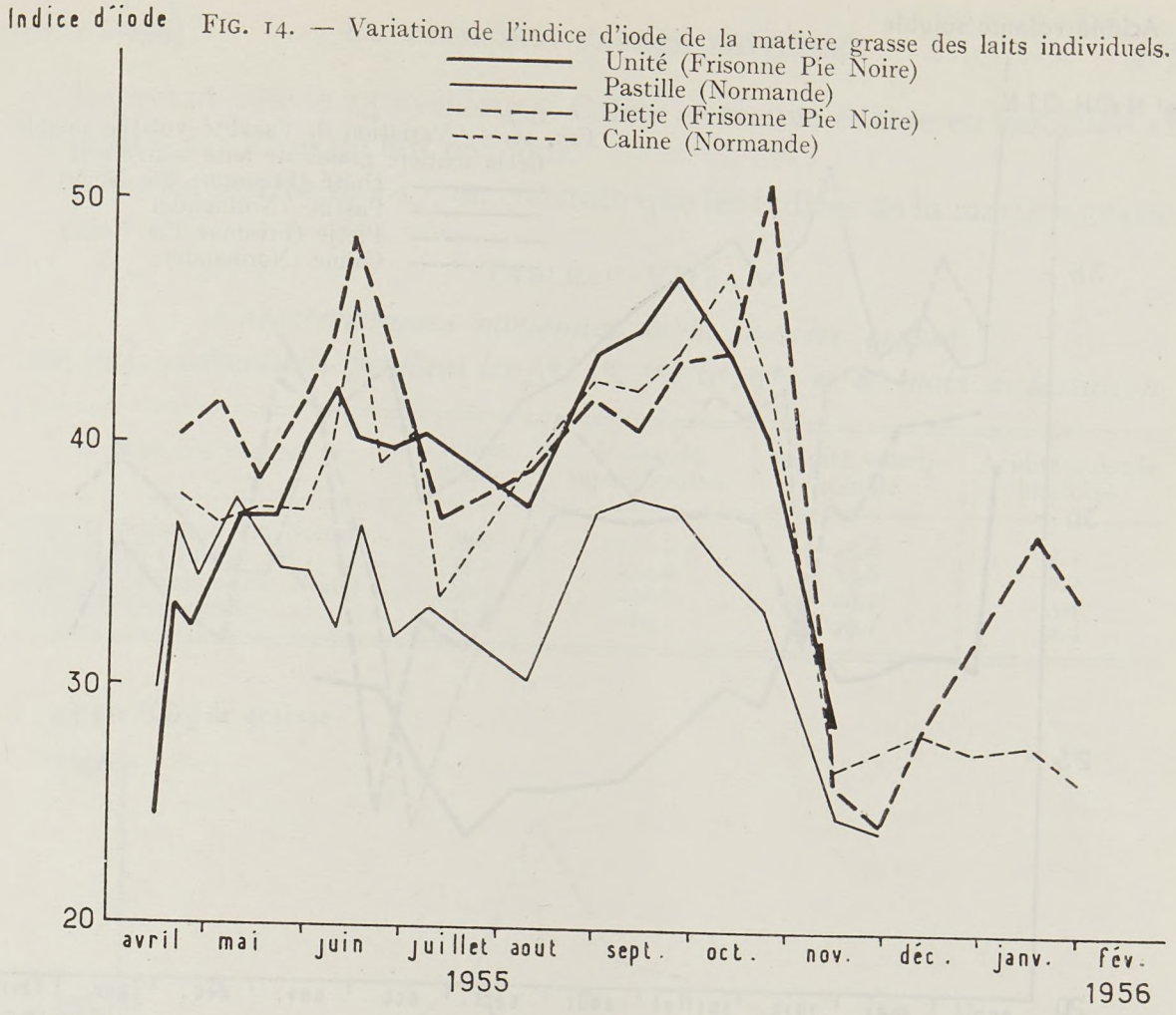


FIG. 14. — Variation de l'indice d'iode de la matière grasse des laits individuels.

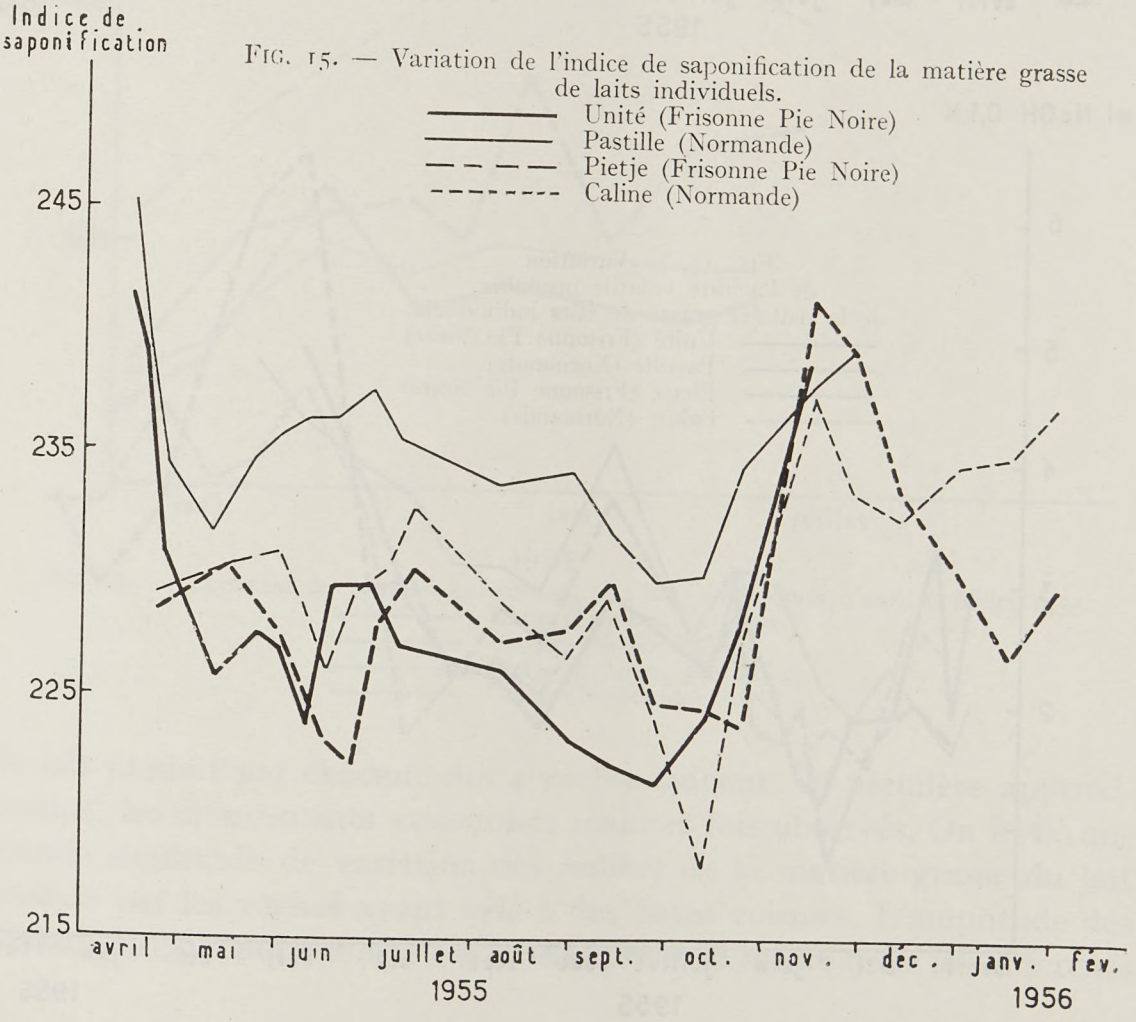


FIG. 15. — Variation de l'indice de saponification de la matière grasse de laits individuels.

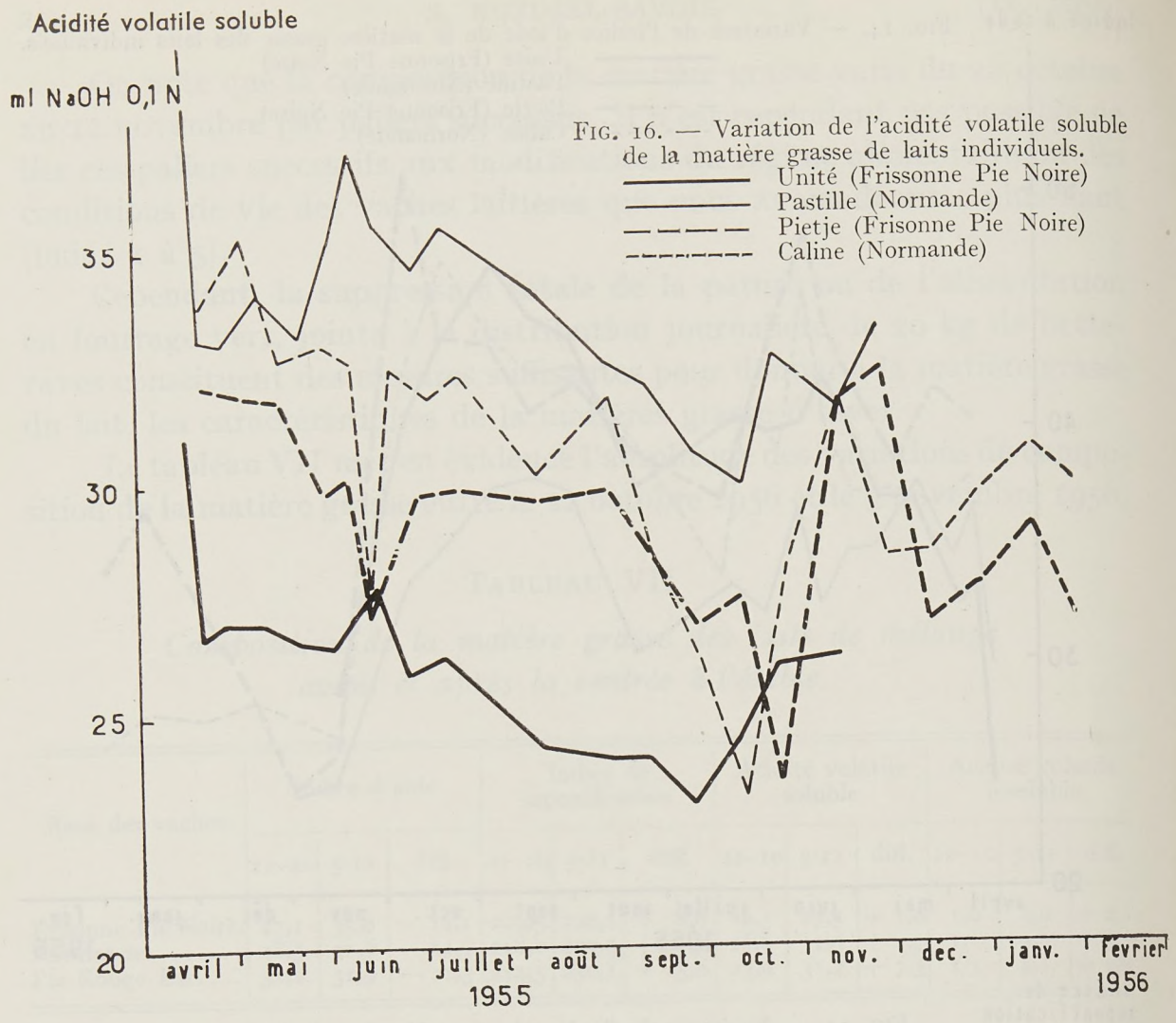


FIG. 16. — Variation de l'acidité volatile soluble de la matière grasse de laits individuels.
Unité (Frissonne Pie Noire)
Pastille (Normande)
Pietje (Frisonne Pie Noire)
Caline (Normande)

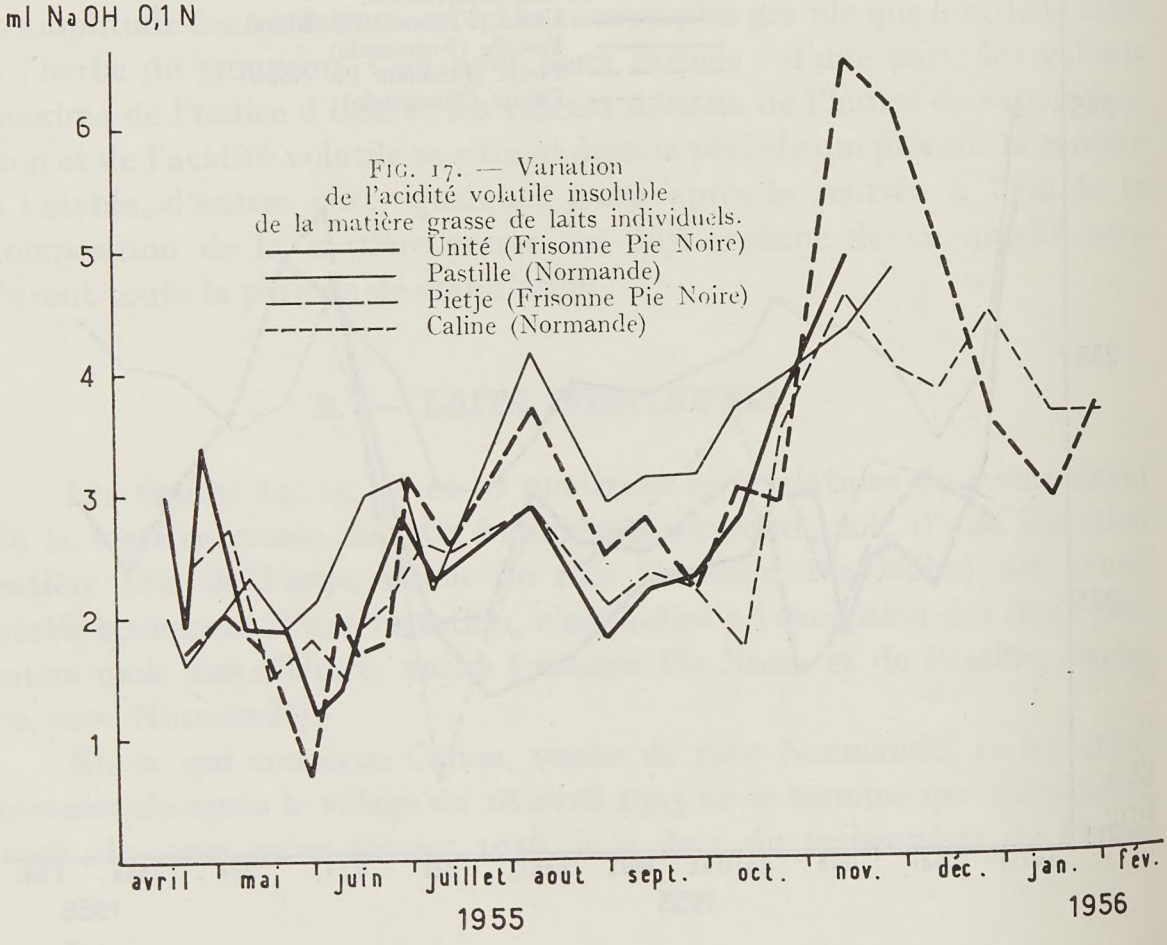


FIG. 17. — Variation de l'acidité volatile insoluble de la matière grasse de laits individuels.
Unité (Frisonne Pie Noire)
Pastille (Normande)
Pietje (Frisonne Pie Noire)
Caline (Normande)

vache ayant vêlé le 15 avril 1955, Caline se trouve encore en lactation et produit 7 à 8 litres de lait par jour.

Sur les figures 14 à 17, on constate que les indices de la matière grasse

TABLEAU VIII

Caractéristiques moyennes de la matière grasse des laits individuels pendant les 3e, 4e, 5e, 6e, 7e, et 8e mois de lactation.

Nom des vaches	Indice d'iode	Indice de saponification	Acidité volatile soluble	Acidité volatile insoluble
UNITÉ (Frisonne Pie Noire)...	39,9	226,9	25,8	2,2
PASTILLE (Normande)	35,0	234,4	33,6	2,7
PIETJE (Frisonne Pie Noire) ..	39,3	228,9	28,2	3,4
CALINE (Normande).....	37,8	229,1	29,1	2,9

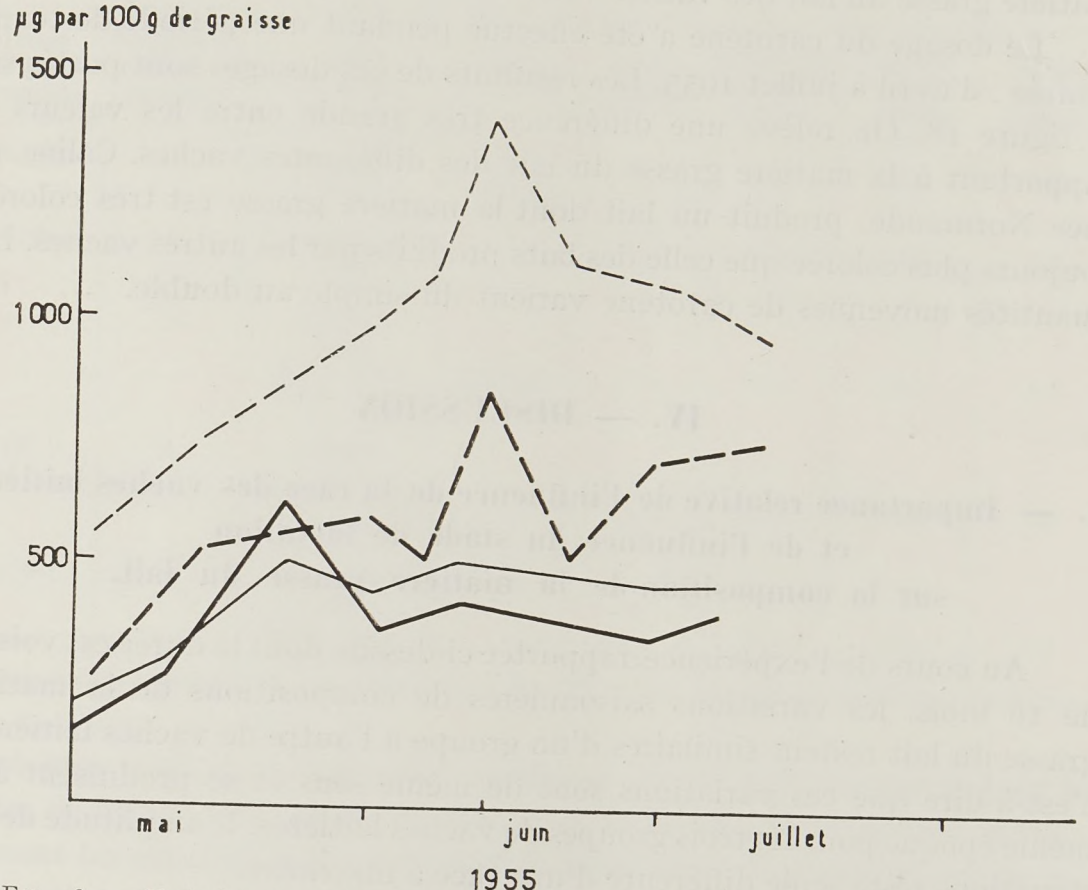


FIG. 18. — Variation du contenu en carotène des laits individuels d'avril à juillet 1955.
——— Unité (Frisonne Pie Noire)
——— Pastille (Normande)
— — — — Pietje (Frisonne Pie Noire)
- - - - - - Caline (Normande)

du lait produit par chacune des 4 vaches suivent, en première approximation, les mouvements saisonniers maintes fois observés. On note une grande similitude de variation des indices de la matière grasse du lait produit par les vaches ayant vêlé à des dates voisines. L'amplitude des variations de chaque indice est sensiblement la même pour les différents

laits, mais la valeur moyenne des différents indices est au contraire très variable d'un lait à l'autre. Les valeurs moyennes sont portées dans le tableau VIII. On ne retient, pour calculer ces valeurs moyennes, que les résultats des analyses effectuées sur les échantillons de lait prélevés pendant les 3e, 4e, 5e, 6e, 7e, et 8e mois de lactation; ceci afin que l'influence du stade de lactation sur la composition de la matière grasse soit en grande partie éliminée. Nous savons, en effet, que cette influence existe principalement au début et à la fin de la lactation.

L'indice d'iode de la matière grasse du lait provenant de Pastille et de Caline, toutes deux de race Normande, est plus bas que l'indice d'iode correspondant des vaches Frisonne Pie Noire. L'indice de saponification et l'acidité volatile soluble sont, à l'inverse de l'indice d'iode plus élevés pour la matière grasse du lait des vaches Normande que pour la matière grasse du lait des vaches Frisonne Pie Noire.

Le dosage du carotène a été effectué pendant une période de temps limitée : d'avril à juillet 1955. Les résultats de ces dosages sont portés sur la figure 18. On relève une différence très grande entre les valeurs se rapportant à la matière grasse du lait des différentes vaches. Caline, de race Normande, produit un lait dont la matière grasse est très colorée, toujours plus colorée que celle des laits produits par les autres vaches. Les quantités moyennes de carotène varient du simple au double.

IV. — DISCUSSION

1. — Importance relative de l'influence de la race des vaches laitières et de l'influence du stade de lactation sur la composition de la matière grasse du lait.

Au cours de l'expérience rapportée ci-dessus dont la durée est voisine de 18 mois, les variations saisonnières de compositions de la matière grasse du lait restent similaires d'un groupe à l'autre de vaches laitières : c'est-à-dire que ces variations sont de même sens et se produisent à la même époque pour les trois groupes de vaches laitières. L'amplitude de ces variations reste seule différente d'une race à une autre.

Nous avons vu (tableau II), que le stade de lactation moyen de chaque troupeau varie au cours de l'expérience. Les variations observées sont particulièrement importantes dans le cas de la race Pie Rouge de l'Est.

Quel que soit le troupeau considéré, le stade de lactation moyen (calculé pendant les mois de septembre 1955, février, juillet et décembre 1956) s'établit entre le 3e et le 8e mois, c'est-à-dire qu'il s'étend sur une période pendant laquelle l'influence propre du stade de lactation sur la composition de la matière grasse du lait est peu marquée.

Pour les troupeaux comprenant soit des vaches de race Normande,

soit des vaches de race Frisonne Pie Noire, les variations du stade de lactation moyen du troupeau sont graduelles du fait d'un nombre toujours assez élevé de vaches en lactation (15 à 25). En ce qui concerne la race Pie Rouge de l'Est, le nombre de vaches est restreint et le stade de lactation moyen peut varier brusquement. Ceci a été observé en juin 1956. Dans le tableau IX, on a porté les caractéristiques chimiques de la matière grasse du lait de mélange produit par les vaches Pie Rouge de l'Est et prélevé le 18 et le 26 juin et le 7 et le 23 juillet 1956. L'introduction dans le lait de mélange,

TABLEAU IX

Variations des caractéristiques chimiques de la matière grasse du lait de mélange provenant des vaches Pie Rouge de l'Est pendant la période du 18 juin au 23 juillet 1956.

Dates des prélèvements	Nombre de vaches en lactation	Nom des vaches	Date de vêlage	Indice d'iode	Indice de saponification	Acidité volatile soluble	Acidité volatile insoluble
18/6/56 ...	2	Amande Aïda	21/12/55 9/12/55	53,1	221,8	22,4	1,5
26/6/56 ...	2	Amande Aïda		51,7	218,0	21,3	1,4
	4	Amande Aïda Bijou 129 P Bijou 130 P	18/6/56 20/6/56	46,4	224,7	29,7	1,6
9/7/56	4	Amande Aïda Bijou 129 P Bijou 130 P		45,3	227,5	29,8	2,7
23/7/56 ...	4	Amande Aïda Bijou 129 P Bijou 130 P		50,4	221,8	26,4	1,6

le 26 juin 1956, du lait produit par Bijou 129 P et Bijou 130 P dont les dates de vêlage respectives sont le 16 et le 18 juin 1956, modifie profondément les caractéristiques chimiques de la matière grasse du lait de mélange provenant des vaches Pie Rouge de l'Est. Ce lait de mélange était constitué, avant le 26 juin, par le lait provenant de deux vaches en lactation : Aïda et Amande, dont les dates de vêlages respectives sont le 9 et le 21/12. 55.

A partir du 26 juin, l'acidité volatile et l'indice de saponification s'élèvent tandis que l'indice d'iode s'abaisse. Ces modifications présentent cependant un caractère fugace; en effet, dès le 23 juillet, les indices de la matière grasse du lait de mélange provenant des 4 vaches Pie Rouge de l'Est en lactation sont à nouveau voisins des indices observés en juin

1956 avant l'introduction du lait produit par les vaches Bijou 129 P et Bijou 130 P.

A la fin de juin 1956, les vaches Amande et Aïda se trouvent en lactation depuis 6 mois environ. Nous savons que l'acidité volatile et l'indice de saponification s'abaissent nettement en fin de lactation, mais diminuent cependant progressivement à partir du 3e mois de lactation; il est possible que, dans le cas d'Amande et d'Aïda, la diminution de l'acidité volatile et de l'indice de saponification soit déjà notable lors du 6e mois de lactation.

Il apparait ainsi, qu'à l'exception de la période de juin-juillet 1956, pendant laquelle l'influence exercée par le stade de lactation sur la composition de la matière grasse du lait provenant des vaches Pie Rouge de l'Est est très nette, cette influence est peu notable pendant le reste de l'année. Il est donc permis de penser que les écarts observés entre les courbes représentatives des variations des différents indices de la matière grasse du lait provenant des vaches Pie Rouge de l'Est et les courbes correspondantes se rapportant à la matière grasse des laits provenant des vaches Frisonne Pie Noire et Normande proviennent de la différence de race des vaches laitières.

Par contre, certains écarts séparant les courbes représentatives des variations des caractéristiques de la matière grasse des laits individuels provenant de vaches ayant vêlé à des dates voisines ne peuvent s'expliquer par la différence de race, mais proviennent d'un stade différent de lactation ou plutôt, dans le cas qui nous intéresse, d'un stade plus ou moins proche de la fin de lactation. Ainsi, les dates de vêlages de Pietje, vache de race Frisonne Pie Noire, et de Caline, vache de race Normande, sont voisines (16 et 18 avril 1956). Par contre, les durées de lactation de chacune de ces deux vaches sont différentes : la lactation de Pietje s'arrête en février 1956, alors que la lactation de Caline se prolonge jusqu'en octobre 1956. Les courbes représentatives des variations des indices de la matière grasse du lait produit par chacune de ces deux vaches montrent un parallèlisme assez net, sauf pendant les mois de janvier et février 1956. On observe à cette époque une diminution de l'indice de saponification et de l'acidité volatile de la matière grasse du lait produit par Pietje. De semblables variations ne sont pas relevées sur la matière grasse du lait produit par Caline (7 à 8 litres par jour).

2. — Influence de la race proprement dite.

Les courbes représentatives des variations des indices d'iode et de saponification sont assez régulières. Les courbes se rapportant aux races Normande et Frisonne Pie Noire sont rapprochées, alors que les courbes se rapportant à la race Pie Rouge de l'Est s'écartent des précédentes.

L'influence de la race des vaches laitières sur la composition de la partie saponifiable de la matière grasse du lait est donc faible, si l'on compare les races Normande et Frisonne Pie Noire.

L'amplitude des variations des courbes se rapportant à la race Pie Rouge de l'Est est plus grande que pour les courbes se rapportant aux deux races. C'est ainsi que l'indice d'iode minima, aussi bien que l'indice d'iode maxima observés au cours de cette étude sont relevés sur la matière grasse du lait de vaches appartenant à la race Pie Rouge de l'Est.

Nous rapprochons ces résultats d'une observation tirée d'analyses antérieures effectuées sur des beurres de différentes origines, dont nous avons mesuré « l'aptitude à l'étalement ». Nous avons trouvé des indices d'iode très élevés (de l'ordre de 50) sur des échantillons de beurre fabriqués en octobre et provenant des départements de la Moselle et des Vosges; dans ces régions, la Race Pie rouge de l'Est est dominante et il est possible que ce soit là l'explication au moins partielle des valeurs élevées de l'indice d'iode.

Au cours de l'année 1956, nous avons noté la coloration relative de la matière grasse des échantillons de lait de mélange prélevés le même jour et provenant des trois races de vaches laitières. Nous avons constaté, qu'en hiver, la matière grasse du lait provenant des vaches de race Pie Rouge de l'Est est peu colorée, moins colorée que la matière grasse des laits provenant des vaches appartenant aux deux autres races. Mais en été la coloration de la matière grasse du lait produit par les vaches appartenant à la race Pie Rouge, se développe. A partir de juin, elle est comparable à celle de la matière grasse du lait provenant des vaches de race Normande, et du début de septembre au 15 novembre, elle est plus prononcée que cette dernière.

Il apparaît donc nettement que, suivant la race à laquelle elles appartiennent, les vaches laitières possèdent une physiologie particulière qui se manifeste précisément lorsque les conditions de vie sont identiques pour toutes comme c'est le cas au Centre National de Recherches Zootechniques.

3. — Influence de l'individualité des vaches laitières.

Notre étude n'a porté que sur quatre laits individuels. Nous avons vu que les différences de composition qui existent entre la matière grasse de laits individuels provenant de vaches appartenant à une même race (Normande ou Frisonne Pie Noire) peuvent être aussi importantes et même plus importantes que les différences de composition qui existent entre la matière grasse des laits de mélange correspondant aux trois races : Normande, Frisonne Pie Noire et Pie Rouge de l'Est.

V. — CONCLUSION

Les résultats obtenus au cours de cette étude, joints aux résultats obtenus au cours de l'étude poursuivie à Echiré (Deux-Sèvres) (4), confirment que la composition de la matière grasse du lait dépend partiellement de la race des vaches laitières.

Il est cependant évident que, par rapport à l'influence de la saison, l'influence de la race des vaches laitières reste faible.

Le cas particulier de la race Pie Rouge de l'Est mériterait d'être repris dans une expérimentation portant sur un plus grand nombre de vaches appartenant à cette race.

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

(1) Swartling (P.) et Mattsson (S.). — On the composition and properties of Jersey milk. Dairy Department, Alnarp Institute, Sweden, report N° 47, 1956.

(2) Mayhead (J. W.) et Barnicoat (C. R.). — Variations in iodine value of milk fats. *J. Dairy Res.*, **23**, 238, 1956.

(3) Pedersen (A. H.). — Problems in the manufacture of butter from the milk of Jersey cows (XIIIe Cong. Intern. Lait, La Haye, 1953 II, (1), 108.

(4) Kuzdzal-Savoie (S.). — Influence de la race des vaches laitières sur la composition de la matière grasse du lait et la qualité du beurre. Expérimentation conduite à Echiré. *Ann. INRA*, série E, Technol (sous presse).

(5) Bejambes (M.) et Savoie (S). — Étude comparée des variations saisonnières de l'indice d'iode des beurres en Normandie et en Alsace. *Chim. et Ind.*, **71**, 501, 1954.

(6) Kuzdzal-Savoie (S.). — Influence du stade de lactation sur les caractéristiques de la matière grasse du beurre. *Ann. INRA*, série E, *Technologie*, **1**, 1956.

CHRONIQUE DES LIVRES

Les méthodes analytiques des céréales. Farines et autres dérivés. Cahiers techniques du C. N. E. R. N. A. Centre National de la Recherche Scientifique. 13, quai Anatole France Paris, 7e.

Le troisième fascicule des Cahiers techniques du Centre National de Coordination des Études et recherches sur la Nutrition et l'Alimentation est consacré aux méthodes analytiques des céréales, farines et autres produits dérivés.

Dans une brève introduction, le Pr TERROINE, animateur du C. N. E. R. N. A. définit lui-même quel a été l'objectif visé : « mettre au point des méthodes étalons, donnant des résultats reproductibles entre des mains convenablement exercées », ce travail ayant été confié « aux personnalités les plus compétentes en la matière du monde de la science et de la technique ». Il serait présomptueux de prétendre résumer les résultats des codifications exposées en une publication de plus de 80 pages, que tout chimiste préoccupé des questions céréalières doit avoir à sa disposition.

On peut cependant indiquer les sujets étudiés, les principes adoptés et souligner les caractéristiques marquantes de ce document.

Seules les techniques relatives aux constituants communs à tous les produits céréaliers ont été examinées : prise d'échantillons, dosage de l'eau, des matières azotées, des cendres, de l'acidité et des matières grasses.

En ce qui concerne l'échantillonnage, on trouve définis le nombre et l'importance des prélèvements à effectuer pour la constitution d'échantillons représentatifs du lot examiné, en fonction de l'importance de ce lot ; les principes à respecter et le mode de prélèvement à pratiquer dans les différents cas les plus fréquents.

Pour le dosage de l'eau, deux méthodes ont été retenues, l'une « de référence fondamentale », et, en raison de la durée d'exécution de cette technique, une « de référence pratique ». La première consiste en une dessiccation sous vide à 50°C en présence d'anhydride phosphorique, jusqu'à poids constant ; la seconde en une dessiccation à 103° C dans une étuve à circulation d'air de tension de vapeur d'eau déterminée, jusqu'à poids constant, avec addition d'un terme correctif.

Les cendres sont déterminées par incinération d'une prise suffisamment importante de produit, à une température de 550 à 650° C, sans fusion, jusqu'à poids constant.

Pour le dosage des matières protéiques, a été retenue la méthode de Kjeldahl, effectuée sur une prise macro-analytique avec minéralisation en présence de catalyseur au mercure et entraînement à la vapeur d'eau surchauffée par un dispositif adapté directement sur le matras d'attaque.

La méthode retenue pour le dosage de l'acidité est la méthode utilisant

l'alcool à 95° pour l'extraction, le titre étant ramené à 18 p. 100 pour le titrage final à la soude. Ce choix a été effectué après étude comparative de différents types de solvants de polarités différentes et de deux types de titrage possibles : titrage à la soude ou titrage à l'iode.

En raison de l'hétérogénéité chimique de la fraction réunie sous la dénomination « matières grasses » et les difficultés d'extraction de ces constituants à partir de certains produits, on ne propose pas de méthode générale de dosage, mais on préconise deux types d'extraction répondant à deux préoccupations différentes :

— *a*) une extraction partielle à l'éther de pétrole au Kumagawa, permettant de récupérer une fraction lipidique non dénaturée qui peut se prêter à une caractérisation qualitative des composants ;

— *b*) une extraction complète après hydrolyse acide de la substance qui permet un dosage quantitatif ; cette hydrolyse pouvant d'ailleurs être effectuée sur le résidu du premier type d'extraction, les deux opérations successives permettent alors une évaluation qualitative et quantitative.

Chaque rapport comporte une revue bibliographique des principales méthodes analytiques relatives au dosage particulier dont il traite.

Les auteurs ont eu le souci de justifier tant du point de vue théorique que pratique le choix des méthodes auxquelles ils se sont ralliés.

Enfin tous les protocoles expérimentaux sont très exactement décrits : réactifs, appareils, manipulations.

L. P.

Cook (A. H.). — **The chemistry and biology of yeasts.** New York, Academic Press Inc., 1958, 763 p.

Ce livre publié sous la direction de A. H. Cook est l'œuvre collective de spécialistes des levures. Chaque article est une synthèse remarquable des travaux effectués jusqu'à présent, travaux en général récents que l'on trouve épars dans de nombreuses publications. Chaque article est complété par une bibliographie abondante et récente (elle occupe 1/10 du livre environ). Chaque chapitre donne l'état actuel d'une question mettant en évidence les points acquis, les points contestés, les hypothèses à vérifier, les questions à résoudre. Chaque fois que cela est nécessaire les auteurs ont avancé des hypothèses à partir de travaux effectués sur les bacilles ou d'autres organismes pour expliquer certains phénomènes à propos des levures. Le livre est agrémenté de tableaux et de graphiques complets et très bien présentés.

L'ouvrage peut être divisé en trois parties :

— problèmes biologiques à propos des levures (classification, écologie, cytologie, génétique) ;

— problèmes chimiques à propos des levures (composition des levures, composition du milieu, métabolisme) ;

— problèmes particuliers sur quelques sujets généraux (technologie de la levure, levures pathogènes, altérations des aliments dues aux levures, floculation des levures).

Après avoir défini le mot levure, précisé les limites de ce groupe et ses relations avec les groupes voisins des champignons, J. Lodder, W. Ch. Slooff et N. J. W. Kreger-Van Rij exposent la classification générale des levures. Après un rappel historique des différentes classifications des levures, elles nous donnent les grandes lignes de leur classification publiée en 1952, puis discutent de son évolution sous l'influence des progrès de la génétique (méthodes de croisement qui ont mis en évidence la présence de spores dans certaines

espèces et définition des lignes phylogénétiques qui éclairent les relations entre les levures et avec les autres champignons).

Après avoir décrit les différents critères utilisés pour la classification des levures, tests morphologiques délimitant les grands groupes et tests physiologiques utiles pour différencier les espèces, les auteurs discutent des dernières données bibliographiques sur des espèces présentant un intérêt particulier, botanique, génétique, biochimique ou technologique.

A. Lund traite de l'écologie des levures, sujet rarement abordé : il rappelle que les levures sont très répandues dans la nature où elles sont saprophytes sur les plantes et les animaux, vivent en symbiose avec certains insectes et sont parasites des plantes, des animaux et même de l'homme. On trouve des levures sur les feuilles et les fleurs, sur l'épiderme des fruits, sur les graines, les racines, les champignons supérieurs, sur les produits laitiers, la viande, les saumures, la pulpe de bois, le fumier, enfin le sol qui constitue le grand réservoir de levures.

Les insectes sont les grands diffuseurs de levures dans la nature. Les levures peuvent être banales, nuisibles ou utiles. L'homme a d'ailleurs domestiqué certaines de ces levures, essentiellement des levures ascosporogènes pour valoriser certains produits agricoles. L'auteur termine son chapitre par l'étude rapide de quelques facteurs externes agissant sur les levures : la lumière, l'oxygène et la dessiccation.

O. Winge et C. Roberts, après avoir rappelé l'historique des découvertes concernant la vie et la reproduction des levures, nous présentent les différentes phases de la vie d'une levure, la cytologie de la levure et la génétique levurienne, travaux qui sont à la base de la classification moderne des levures.

Dans une première partie, après avoir défini l'haplophase et la diplophase, les auteurs décrivent les différents types de croisements et les phases de la conjugaison chez les levures. Ils étudient de façon approfondie la sporulation chez la levure, critiquant les différentes méthodes de sporulation proposées, exposent l'influence du milieu sur la sporulation, nous font part des conceptions opposées quant à la cytologie des levures, et nous montrent que c'est là un domaine où il reste beaucoup à faire. La polyploïdie chez les levures est discutée.

Dans une deuxième partie, plus spécialement génétique, ils font le point des recherches dans ce domaine. Ils montrent d'abord l'importance de la génétique levurienne, tant à cause de la facilité d'emploi des levures comme matériel génétique, que de l'utilisation des résultats transposés dans les industries de fermentation ; après avoir décrit les différentes techniques d'isolement des spores et les techniques d'hybridation, ils insistent sur la ségrégation mendélienne dans les levures, les différentes méthodes que l'on a utilisées pour la vérifier, l'adaptation à long terme, les gènes gouvernant les réactions fermentatives, en particulier pour le raffinose et le galactose.

Après avoir rappelé quelques cas de ségrégations irrégulières, les phénomènes de liaison de gènes chez les levures, ils étudient de façon approfondie, les mutations et les variations chez les levures, en particulier en ce qui concerne les colonies géantes, la fermentation du maltose, la déficience en adénine. et les mutations sous l'influence des radiations artificielles. Un important paragraphe sur l'hérédité cytoplasmique résume les travaux sur la question.

A.A. Eddy étudie la composition chimique des levures. Il passe en revue les constituants minéraux, il remarque la grande influence exercée par le milieu et insiste sur la question des métaux (Mg et K), les vitamines, principalement

celles du groupe B et leurs liaisons avec les coenzymes dérivés, les acides aminés libres et combinés. Il étudie spécialement les acides nucléiques de la levure (isolement, structure, teneur) et les bases correspondantes, les carbohydrates, insistant particulièrement sur les polysaccharides de *S. cerevisiae* (glycogène, mannane ou gomme de levure isolée de la levure autolysée, glucane ou cellulose de levure), sur les hydrates de carbone extraits des capsules de *Torulopsis* (amidon et pentosane), la glucosamine et la chitine. Abordant les lipides, il insiste particulièrement sur les glycérophosphatides, les stérols et les caroténoïdes. Il traite ensuite les pigments azotés de la levure à propos desquels il s'attache surtout aux dérivés du tétrapyrrole — tels que les porphyrines contenant du fer (parmi lesquelles les cytochromes qui jouent un rôle fondamental dans les réactions d'oxydo-réduction) — et les flavoprotéines. Il traite ensuite des protéines à action enzymatique telles que la glycéraldéhyde-phosphatodéshydrogénase. Enfin traitant de l'eau dans la levure, il fait la distinction entre l'eau interne et l'eau externe, discute de l'effet de la pression osmotique sur la teneur en eau des cellules et de la perméabilité de la paroi cellulaire de la levure.

E. O. Morris, après avoir étudié la cinétique de la croissance des levures et les différentes méthodes utilisées pour la détermination du nombre de ces levures, étudie les différentes sources d'aliment de la levure. Il attache une particulière importance aux courbes de croissance et discute des différentes phases de la croissance de la levure. La formation des colonies dans un milieu solide, principalement des colonies géantes, est étudiée. Après avoir passé en revue les différentes sources de carbone (sucres, acides organiques, acides aminés, glycérol, glucosides) et d'azote (azote atmosphérique, azote organique, azote minéral), et les différents composés minéraux, principalement les métaux utilisés par la levure, il s'étend sur les facteurs de croissance des levures, leurs méthodes de dosage par les levures, et l'influence de ces différents facteurs sur la croissance. Après avoir étudié l'effet des conditions physiques sur la croissance des levures (aération, température, pH) il expose longuement les facteurs influençant la production des spores, cette production étant importante pour des raisons taxonomique et génétique. De même il étudie les facteurs influençant la production de pseudomycelium et les différentes méthodes pouvant être utilisées pour la conservation des cultures de levures, en particulier la lyophilisation.

Après avoir rappelé les difficultés de l'étude du problème des mécanismes de la fermentation et de la respiration, les nombreuses hypothèses émises sur ce sujet et signalé que la résolution des problèmes est fonction des connaissances biochimiques de l'époque, F. F. Nord et S. Weiss font le point de ces problèmes en évolution constante. Ils montrent que plusieurs points de vue peuvent être vrais, le schéma de dégradation des sucres par les germes n'étant pas unique. Ils décrivent et discutent chaque phase de la fermentation alcoolique et abordent la fermentation des hexoses autres que le glucose et le fructose, et des disaccharides, puis différentes formes de fermentation dans lesquelles se produit du glycérol, sous l'influence du sulfite de sodium, en milieu alcalin ou en même temps que l'acide pyruvique. Le mécanisme de l'oxydation aérobie du glucose est étudié : synthèse des découvertes très récentes sur la transformation du glucose par la levure en hydrates de carbone de C_2 à C_7, tranformation qui a permis d'expliquer la synthèse et la dégradation des pentoses ; historique et description du cycle de l'acide citrique. Après avoir noté qu'aucune théorie n'explique de façon satisfaisante l'effet Pasteur, les auteurs

terminent par quelques considérations générales sur les différentes dégradations et concluent que « les résultats toujours changeants obtenus dans le champ de la microbiologie, montrent seulement le besoin de continuer les recherches dans cette voie ».

W. E. TREVELYAN fait une synthèse de la physiologie complète des hydrates de carbone (glycogène, mannane, glucane et tréhalose) dans la cellule de levure. Après avoir noté l'intérêt de ces corps (intérêt théorique pour expliquer le mécanisme du métabolisme et intérêt pratique pour assurer la stabilité des levures industrielles) et certaines difficultés se rapportant à ces problèmes, problèmes essentiellement de cinétique (équilibre entre la formation et la destruction de ces hydrates de carbone), il étudie la préparation des hydrates de carbone à partir de la levure de brasserie ou de boulangerie, leur état dans les cellules vivantes, et les enzymes qui catalysent in vitro leur formation et leur dégradation, particulièrement celles du glycogène et du tréhalose.

Il étudie la transformation du glucose en glycogène dans les cellules, la fermentation endogène du glycogène et du tréhalose, la synthèse du glycogène dans les cellules de levures non proliférantes, puis dans les cellules proliférantes.

G. HARRIS, dans un des chapitres les plus importants, traite de l'assimilation et surtout de la synthèse des matières azotées dans les cellules de levures, ainsi que du métabolisme du soufre qui lui est souvent lié.

Après avoir rappelé que la levure est capable d'assimiler l'azote atmosphérique, l'azote nitrique et surtout l'ammoniac, l'auteur décrit la destruction des peptides et protéines par la levure, puis la destruction des acides aminés ou l'assimilation globale de ces acides, s'attachant particulièrement au cas de l'acide glutamique et de l'acide aspartique.

L'auteur rappelle les relations entre le métabolisme des acides aminés et le métabolisme des hydrates de carbone par l'intermédiaire du cycle de KREBS et décrit la biosynthèse des acides aminés en les classant par familles : famille de l'acide glutamique (acide glutamique, arginine, proline), famille de l'acide aspartique (acide aspartique, thréonine, isoleucine, méthionine), lysine, famille de l'acide pyruvique (α-alanine, valine, leucine), histidine, famille de la sérine (sérine, glycocolle, cystéine) et la famille des acides aromatiques (phényl-alanine, tyrosine, tryptophane).

L'auteur traite ensuite du métabolisme des acides nucléiques et de leurs constituants, s'attachant plus particulièrement aux bases puriques et pyrimidiques, puis de la synthèse des peptides et des protéines dans la limite des travaux effectués sur les levures.

Enfin dans un dernier paragraphe, il étudie le métabolisme du soufre, ses liaisons avec le métabolisme de l'azote, son rôle dans l'action de certaines enzymes.

MAGNUS PYKE, traite de la technologie de la levure, insistant plus particulièrement sur la levure de boulangerie. Après avoir fait un rapide historique, il s'attache aux méthodes modernes de préparation de la levure à partir de la mélasse et discute de la préparation du milieu de culture, des facteurs influençant la croissance de la levure sur ce milieu, du calcul du rendement, du problème de la mousse, de la préparation des levains, de la conservation des souches et de la technique industrielle de fabrication. Il décrit le procédé récent de fabrication des levures séchées à l'air chaud, produits plus faciles à conserver.

Il traite ensuite des levures sources de protéines et souvent moyen d'oxydation des eaux résiduaires (préparation de levures fourragères à partir

des mélasses et des eaux sulfitiques de papeterie) et des levures sources de matières grasses.

Après avoir évoqué la préparation des levains de brasserie, il décrit quelques préparations médicinales et nutritionelles où la levure, sous forme séchée ou à l'état d'extrait, intervient comme source de vitamines B, de glutathion ou d'acides nucléiques. Il termine en évoquant la levure, réactif chimique pour la fabrication du glycérol, de l'éphédrine, du gaz carbonique et comme source d'invertase.

G. C. Ainsworth rappelle que si l'on rencontre quelques levures pathogènes chez l'homme et les animaux supérieurs, on en rencontre peu chez les animaux inférieurs ou les plantes. Après avoir remarqué que les levures sont souvent associées aux animaux supérieurs, principalement à leur appareil respiratoire ou digestif, il décrit les principales espèces pathogènes : *Pityrosporum ovale*, faiblement pathogène, se développant sur la peau, *Candida albicans*, très répandue dans la nature, responsable du muguet chez les enfants et de maladies de peau chez les adultes, *Cryptococcus neoformans* également très répandu, en particulier dans les fruits en fermentation, responsable de maladie de peau chez les humains et de nombreux animaux (le pigeon en particulier) ; il cite quelques maladies dues à la forme levure de certains champignons et discute de la relation entre la phase levure de ces champignons et leur pouvoir pathogène.

M. Ingram indique comment les propriétés biologiques des levures déterminent leur activité par rapport aux autres germes dans l'altération des aliments.

Dans une première partie, il expose les facteurs favorisant le développement de ces levures : contamination initiale apportée par la matière première, l'air, le sol ou l'eau, les insectes ou les hommes, par des aliments déjà avariés mais le plus souvent par le matériel de préparation insuffisamment nettoyé ; les levures qui poussent plus lentement que la plupart des bactéries ont cependant un pouvoir compétitif fort par le fait qu'elles sont plus résistantes à des conditions de milieu défavorables (pH, alcool, absence de vitamines).

Dans les aliments, le développement des levures est favorisé par la présence de sucre, de matière grasse, ou d'acide organique ; elles tolèrent de fortes acidités et de bas potentiels d'oxydo-réduction, elles sont peu résistantes aux hautes températures, mais très résistantes aux basses températures, une faible « activité aqueuse » les défavorise moins que les bactéries ou les moisissures.

L'auteur fait ensuite une revue des principales détériorations dues aux levures, par aliments : céréales ; fruits frais où elles sont nombreuses mais rarement nuisibles ; jus de fruits, particulièrement jus d'agrumes, de pommes et de raisins ; fruits séchés, jus concentrés, produits sucrés dans lesquels on rencontre les levures osmophiles ; pickles où dominent des levures résistantes au sel et à l'acide acétique ; viandes où les levures se développent surtout sur les produits secs ou traités aux antibiotiques ; produits laitiers où elles causent des altérations particulièrement dans les fromages et les beurres ; aliments congelés où se rencontrent des levures cryophiles.

L'auteur termine par une discussion sur les milieux sélectifs utilisés pour le contrôle des levures et conclut à la nécessité d'étudier davantage la physiologie de ces levures.

H. E. Jansen présente le problème de la floculation des levures, problème très complexe intéressant particulièrement la brasserie. Après avoir défini la floculation, il étudie de façon critique les différents travaux ayant trait à

ce problème, particulièrement à ceux effectués avant 1940, sur les levures de fermentation basse : influence de la composition du milieu, des sels minéraux, des substances de croissance ; théorie symbiotique de la floculation (agglutination), théorie enzymatique (peptase) ; influence des levures dont la membrane adsorbe oxalate, phosphate, résine ou peptone-tanin ; essai de rattachement de la floculation aux problèmes de la chimie colloïdale ; enfin travaux de Burns, sur les levures de fermentation haute.

Puis il expose les vues actuelles sur la floculation : les recherches génétiques ont donné des résultats prometteurs mais elles n'expliquent pas tout, et les facteurs du milieu ont été également étudiés : charge électrique de la cellule, phénomènes d'adsorption, action de diverses substances (sucres, acides humiques, tréberine, furfural).

Après avoir rappelé les différentes méthodes de mesure de la floculation et fait le point de l'application des connaissances sur la floculation à la pratique brassicole, il conclut en montrant qu'aucune théorie n'explique l'ensemble du phénomène, que les difficultés demeurent, ce qui justifie encore des recherches.

En conclusion, ce livre remarquable est très utile pour les chercheurs spécialistes des levures et constitue une source de documentation indispensable aussi bien pour les scientifiques s'intéressant à la microbiologie ou à la physiologie générale que pour les techniciens utilisant les levures.

P. B.

Le Directeur-Gérant : B. LACLAVIÈRE.

L'INHIBITION PAR L'ACIDE SULFUREUX DE L'OXYDATION DE L'ETHANOL PAR ACETOBACTER RANCENS

PAR

P. DUPUY

Station de Technologie végétale, Versailles.

PLAN DU MÉMOIRE

Introduction.

CHAPITRE PREMIER

TRAVAUX ANTÉRIEURS CONCERNANT CERTAINES RÉACTIONS DE L'ACIDE SULFUREUX

I. — Réaction de l'acide sulfureux sur les liaisons disulfures.

II. — Réaction de l'acide sulfureux sur les protides.

a) l'insuline,
b) le venin de serpent,
c) la laine.

III. — Inhibition des réactions enzymatiques par l'acide sulfureux.

a) fermentations déviées,
b) formation d'un sulfonate,
c) combinaison du sulfite avec le diphosphopyridine nucléotide.

CHAPITRE II

MATÉRIEL ET TECHNIQUES UTILISÉS

A. — Techniques bactériologiques.

I. — Description de la souche bactérienne.

a) caractères morphologiques,
b) caractères microscopiques,
c) caractères biochimiques.

II. — Conditions de culture.

a) milieu de culture,
b) réalisation de l'aérobiose,
c) préparation de la suspension de bactéries non proliférantes,
d) préparation d'un extrait enzymatique.

B. — Techniques chimiques.

a) dosage du sulfite,
— méthode par iodométrie,
— méthode colorimétrique,
— oxydation du sulfite pendant les opérations de centrifugation.

b) dosage de l'éthanal,
c) dosage de l'acide acétique,
d) dosage de l'éthanol,
e) dosage de l'azote,
f) appareillage.

CHAPITRE III

ÉTUDE DE L'OXYDATION DE L'ÉTHANOL ET DE SON INHIBITION PAR LE SULFITE

I. — Oxydation de l'éthanol.
a) choix d'un tampon,
b) action du pH et de la concentration en éthanol.

II. — Inhibition de l'oxydation de l'éthanol par l'acide sulfureux.
a) oxydation du sulfite au cours des expériences,
b) avantage d'une incubation en présence d'acide sulfureux,
c) conditions de l'incubation,
d) bilan de l'oxydation de l'éthanol en absence et en présence d'acide sulfureux,
e) inhibition par l'acide sulfureux,
— inhibition de l'oxydation de divers substrats,
— influence du pH,
— réversibilité de l'inhibition,
— nature de l'inhibition.
Discussion des résultats.

CHAPITRE IV

FIXATION DE L'ACIDE SULFUREUX SUR LES BACTÉRIES

I. — Techniques.
a) purification du sulfite radioactif,
b) mesure de la radioactivité.

II. — Fixation de l'acide sulfureux sur les bactéries.
a) cas des bactéries traitées à l'iode ou inactivées par chauffage,
b) variation de l'acide sulfureux fixé en fonction du pH,
c) variation de l'acide sulfureux en fonction de la concentration,
d) recherche de la fixation du sulfate.

III. — Réversibilité de la fixation de l'acide sulfureux.
Discussion des résultats.

CHAPITRE V

COMBINAISON DE L'ACIDE SULFUREUX AVEC LA CYSTÉINE

I. — Spectre de l'acide sulfureux.
a) résultats antérieurs,
b) résultats personnels,
— préparation des échantillons,
— forme du spectre,
— variation du spectre en fonction du pH,
— signification de l'absorption à 275 mμ.

II. — Spectre de la cystine, de la cystéine et de l'acide cystéine S sulfonique.

III. — Spectre de la combinaison cystéine-acide sulfureux.

a) influence du pH,
b) étude de la combinaison par la méthode des variations continues,
c) réversibilité de la réaction.

IV. — Spectre différentiel des bactéries en présence du sulfite.

Discussion des résultats.

CONCLUSION

Explication du mode d'action de l'acide sulfureux en tant qu'inhibiteur.

Propriétés réductrices.
Modification de la perméabilité des membranes.
Propriétés acides.
Combinaison avec les aldéhydes.
Combinaison avec le diphosphopyridine nucléotide.
Combinaison avec les fonctions thiols.

INTRODUCTION

L'anhydride sulfureux, ses solutions ou les sels qui en dérivent sont parmi les antiseptiques et les inhibiteurs les plus anciennement utilisés. L'emploi de l'anhydride sulfureux remonte au moins à la civilisation romaine et peut-être égyptienne, où il servait à l'assainissement des vases vinaires. Bien que nous disposions à présent de très nombreux antiseptiques et inhibiteurs, on continue à en faire un large usage, chaque fois qu'on peut l'employer en milieu acide. On sait en effet, depuis longtemps, que les sulfites sont d'autant plus actifs que le milieu est plus acide.

Plusieurs avantages expliquent que l'anhydride sulfureux soit encore préféré à des moyens plus modernes. C'est le seul antiseptique qui puisse se prévaloir d'un usage aussi long, et vingt siècles d'emploi constant en œnologie n'ont laissé le souvenir d'aucun effet dévaforable sur le consommateur. Il est donc normal que quelques publications faisant état d'une faible action toxique à haute dose n'aient rien changé à son emploi (2). D'autres composés se sont aussi montrés dépourvus de toxicité dans des expériences de laboratoire, mais étant d'invention beaucoup plus récente, il leur manque encore cette consécration de l'usage. Du point de vue physiologique, il est rassurant de savoir que le sulfite peut être métabolisé par les animaux supérieurs (65) (31). A côté de son innocuité, il possède aussi une autre propriété très avantageuse, c'est sa volatilité. Il est donc possible de l'éliminer des produits alimentaires lorsqu'il y est devenu

inutile et cela facilite grandement son emploi du point de vue technologique.

Actuellement, l'anhydride sulfureux liquéfié ou en solution, le sulfite de sodium et le métabisulfite de potassium, sont largement employés dans les industries utilisant des processus biologiques. Ils sont utilisés pour la conservation des jus de fruits à cause de leur pouvoir antiseptique et comme inhibiteurs de la polyphenol oxydase et des réactions de brunissement provoquées soit par des enzymes, soit par des réactions chimiques non enzymatiques.

En œnologie et en cidrerie, ils contribuent à la sélection des microorganismes utiles, qui sont moins sensibles à leur action que les germes provoquant des altérations. Ils assurent ensuite la conservation des produits élaborés et particulièrement de ceux qui, à cause du sucre qu'ils contiennent, ne présentent pas une résistance suffisante au développement des levures ou des lactobacilles. Dans la préparation des ensilages, on a constaté récemment qu'une dose de 4 grammes de métabisulfite de sodium par kg, suffit à empêcher la fermentation butyrique et la dégradation des substances azotées. Dans cette application, il se révèle comme antiseptique très efficace, particulièrement bon marché et tout à fait inoffensif pour les ruminants qui possèdent une flore intestinale capable de le métaboliser. Pour la conservation des fruits et légumes, ils servent à préparer les solutions où se fait le stockage avant de les transformer en confiture ou en purée. Les fruits desséchés subissent aussi habituellement un traitement à l'anhydride sulfureux. La viande et le poisson sont aussi susceptibles d'être traités par ce procédé, afin d'en faciliter la conservation (48).

Dans toutes ces applications, l'anhydride sulfureux est utilisé pour ses propriétés antiseptiques, ou bien pour le pouvoir inhibiteur qu'il présente envers certaines enzymes et en particulier la polyphenol oxydase.

Malgré un usage aussi largement répandu, le mode d'action de l'anhydride sulfureux reste obscur. Ce composé est extrêmement réactif : c'est un réducteur énergique, il donne facilement des composés d'addition non seulement avec les aldéhydes et les cétones, mais aussi avec les liaisons éthyléniques et les amines. Parmi toutes les réactions possibles, il n'est donc pas commode de retrouver celles qui sont responsables de l'action inhibitrice ou antiseptique.

Le but de ce travail est d'étudier l'inhibition que provoque l'anhydride sulfureux sur la respiration d'une souche d'*Acetobacter*. On connaît depuis longtemps ses actions bactériostatique et bactéricide, pour lesquelles les *Acetobacter* s'étaient révélés des organismes particulièrement sensibles (71). Nous avons pensé que cette espèce conviendrait particulièrement bien à notre étude. En effet, ces bactéries qui supportent des acidités élevées, permettent d'étudier l'inhibition dans une large gamme de pH.

Le travail que nous allons présenter sera divisé en trois parties. Dans la première, nous étudierons l'oxydation de l'éthanol par une souche d'*Acetobacter rancens* que nous avons isolée et identifiée. On démontrera que cette réaction peut être inhibée par l'acide sulfureux et qu'il s'agit d'une inhibition réversible non compétitive avec le substrat. Les résultats expérimentaux ont été obtenus par des mesures de respiration en présence d'éthanol, et en utilisant la technique micromanométrique de WARBURG.

Dans une deuxième partie, on mettra en évidence la fixation du sulfite sur les bactéries. Ce phénomène sera étudié en fonction du pH et de la température. On démontrera qu'il est réversible et qu'il possède un intérêt biologique puisqu'il n'existe que dans les bactéries vivantes. Cette étude a été réalisée en employant du sulfite radioactif dont on a mesuré la distribution, entre la phase liquide et les bactéries, au moyen d'un compteur de Geiger Muller.

La troisième partie sera consacrée à la mise en évidence d'une nouvelle réaction chimique, qui se produit entre le sulfite et la cystéine, car elle peut servir de modèle à la fixation du sulfite sur les bactéries. L'existence d'une combinaison sera déduite de la modification que subit le spectre du sulfite lorsqu'on y ajoute de la cystéine. L'étude quantitative du phénomène sera faite par la méthode des variations continues de Job, et on démontrera que la liaison des deux molécules se fait par l'intermédiaire de la fonction thiol. Ces résultats ont été déduits des mesures spectrophotométriques dans l'ultra-violet.

Dans la conclusion de ce travail, nous passerons en revue les diverses théories proposées pour expliquer l'action inhibitrice de l'acide sulfureux. En les discutant, nous montrerons qu'aucune n'est satisfaisante pour rendre compte de l'inhibition que nous avons étudiée avec *A. rancens*. En revanche, nous indiquerons les grandes analogies qui existent entre les trois phénomènes étudiés :

— inhibition de l'oxydation de l'éthanol ;
— fixation du sulfite sur les bactéries ;
— réaction du sulfite avec les corps ayant une fonction thiol.

Ceci nous amènera à proposer un mécanisme nouveau dans lequel l'inhibition s'explique par la réaction du sulfite avec les fonctions thiols de la protéine enzymatique.

L'exposé de ces résultats expérimentaux sera précédé d'une revue bibliographique des travaux concernant la réaction du sulfite sur les liaisons disulfures, et d'une analyse des diverses inhibitions de réactions enzymatiques qu'il est susceptible de provoquer.

Un chapitre spécial décrira d'une manière détaillée les techniques que nous avons utilisées, et fournira leur justification.

Ce travail a été réalisé à la Station de Technologie Végétale de

l'Institut National de la Recherche Agronomique à Versailles. Les expériences faisant appel aux techniques des traceurs radioactifs et de spectrophotométrie ont été effectuées au Laboratoire des Isotopes de l'Institut Pasteur à Paris.

CHAPITRE PREMIER

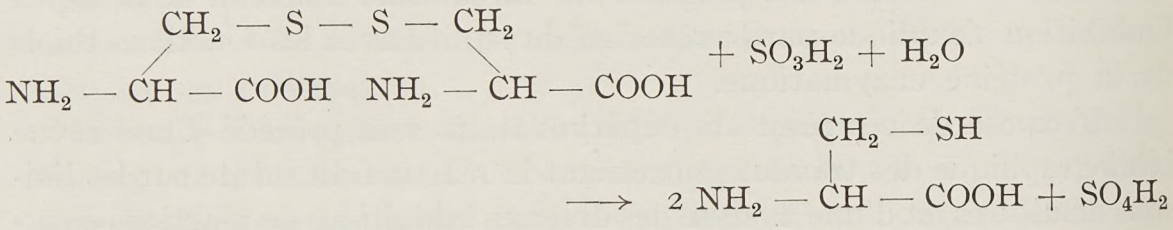
TRAVAUX ANTÉRIEURS CONCERNANT CERTAINES RÉACTIONS DE L'ACIDE SULFUREUX

L'acide sulfureux peut prendre part à un très grand nombre de réactions, mais toutes n'offrent pas le même intérêt biochimique. Cette revue est limitée à celles qui sont utiles à l'interprétation ou à la discussion de nos résultats.

Dans une première partie on examine la réaction de l'acide sulfureux sur les liaisons disulfures, ou réaction de Clarke. On l'étudie d'abord sur des corps de composition chimique bien définie, en particulier la cystine, puis on l'étend à des corps beaucoup plus complexes, tels que l'insuline, et aussi à des corps beaucoup moins bien définis comme la laine ou le venin de serpent. La deuxième partie est consacrée aux divers inhibitions enzymatiques provoquées par l'acide sulfureux. Il est possible de les attribuer à trois réactions chimiques différentes : soit à sa combinaison avec un produit intermédiaire aldéhydique ou cétonique, soit à la formation d'un sulfonate doué de propriétés inhibitrices, soit enfin à sa combinaison avec le diphosphopyridine-nucléotide oxydé ou réduit.

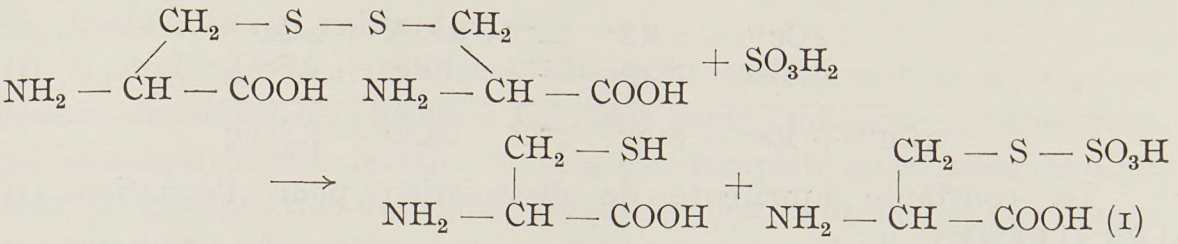
I. — Réaction de l'acide sulfureux sur les liaisons disulfures.

Jusqu'en 1932, on a admis que le sulfite pouvait réduire la cystine en cystéine suivant la réaction :



Étudiant cette réaction, Clarke (16) n'a pas trouvé de formation de sulfate et seulement la moitié de la cystéine prévue par l'équation. En revanche, il a mis en évidence un nouveau composé, qu'il appelle l'acide S-cystéine sulfonique. La réaction a dû être modifiée en

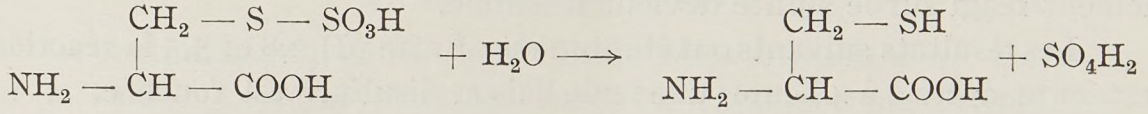
conséquence et elle est parfaitement représentée par l'équation suivante :



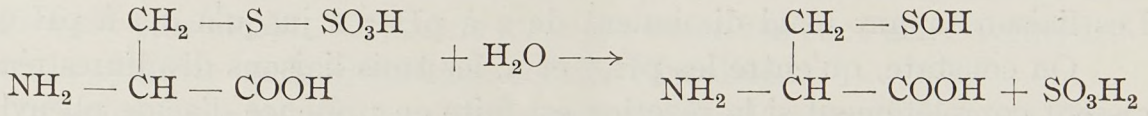
Depuis sa découverte, cette réaction (1) est habituellement désignée sous le nom de réaction de Clarke. La dénomination acide S-cystéine sulfonique est employée à peu près sans interruption par les auteurs et on la trouve encore dans les publications de KOLTHOFF (81), le dernier en date (1955). Dans les études concernant l'oxydation biologique du sulfite, la tendance actuelle paraît être de désigner le même composé comme l'acide cystéine thiosulfonique. HANDLER et FRIDOVICH (38), qui utilisent cette terminologie, lui attribuent par erreur la formule suivante R — S — SO_3. En discutant leur travail, SORBO (77) a fait remarquer que le nom de thiosulfonate est habituellement appliqué par les chimistes organiciens aux corps ayant la structure R — SO_2 — S. Il propose que le produit de la réaction du sulfite sur la cystine soit appelé ester thiosulfonique. Dans ce travail nous avons adopté la dénomination employée par CLARKE (16), puisqu'elle est encore la plus largement utilisée.

L'acide lui-même n'a pas été isolé, mais ses sels d'ammonium et de sodium ont été préparés. Ils présentent les propriétés suivantes : bonne solubilité dans l'eau, même pour le sel d'argent, et insolubilité dans l'alcool.

L'hydrolyse acide se réalise en 24 heures à 125° dans un mélange d'acides chlorhydrique et formique. Le soufre se retrouve en partie égale sous forme de sulfate et de cystéine. Dans ce cas, il ne se produit jamais de sulfite. La réaction serait donc :



En milieu alcalin, selon ELSWORTH et PHILLIPS (25), l'hydrolyse donne naissance à du sulfite et de l'acide cystéine sulfénique.



KOLTHOFF et STRICKS (52) ont montré que la réaction de Clarke peut être complète lorsqu'on la réalise en présence d'un réactif oxydant des groupes thiols. Ainsi, en l'absence d'oxygène, en présence de sel cuivrique et à condition que le rapport moléculaire du cuivre et de la cystéine soit

de 2 à 1, on obtient les réactions du schéma suivant qui peuvent être suivies par polarographie :

$$\begin{array}{rcl} 2\,Cu^{++} + 2\,RS^- & \rightleftarrows & RSSR + 2\,Cu^+ \\ RSSR + SO_3^{--} & \rightleftarrows & RS^- + RSSO_3^- \\ \hline 2\,Cu^{++} + RS^- + SO_3^{--} & \rightleftarrows & 2\,Cu^+ + RSSO_3^- \end{array} \qquad (1)$$

La constante apparente de dissociation pour l'équation (1) $\frac{|RS^-||RSSO_3^-|}{|RSSR||SO_3^=|}$ varie de 0,6 10^2 à pH 13,4 jusque 8,9 10^2 à pH 7,75. Ceci provient de ce que le pH modifie la dissociation de la fonction thiol de la cystéine ainsi que celle des fonctions amines. Stricks et Kolthoff (80) ont montré que l'acide dithioglycolique donne aussi une réaction de Clarke avec une constante apparente de 5 10_3. Micheel et Emde (61) ont aussi trouvé que le glutathion oxydé se comporte, en présence de sulfite, de la même façon que la cystine.

Tous ces travaux montrent que la réaction de Clarke se produit facilement avec un certain nombre de composés chimiques définis possédant une liaison disulfure. Nous allons voir que ceci est encore vrai dans le cas de composés plus complexes, qui renferment des liaisons disulfures.

II. — Réaction de l'acide sulfureux sur les protides.

a) L'insuline.

Ce polypeptide qui contient trois liaisons disulfures est inactivé par l'acide sulfhydrique, la cystéine, le glutathion et l'acide sulfureux. Le fait a été constaté par Miller et du Vigneaud (62) et étudié par Cecil et Loening (13). La réaction a été suivie par titrage ampérométrique au nitrate d'argent du groupe thiol formé, dans une zone de pH allant de 2,8 à 9 et des températures comprises entre 25° et 60°. L'étude cinétique du phénomène est rendue impossible par le fait que l'insuline ayant partiellement réagi sur le sulfite devient insoluble.

Les résultats suivants ont été obtenus. Entre pH 2,8 et 5,5 la réaction est lente, après 2 à 4 heures une seule liaison disulfure est touchée.

Entre pH 6,2 et 7,2 la réaction est plus rapide, après 10 à 30 minutes deux liaisons sont touchées.

Entre pH 7,2 et 9,0 le thiol s'ionise et la réaction devient réversible. Les liaisons ayant réagi diminuent de 2 à pH 7,2 jusqu'à 0,4 à pH 9.

On constate, qu'entre les pH 7 et 9, les trois liaisons disulfures réagissent complètement si la réaction est faite en présence d'acide phénylmercurique.

Si l'on compare ces résultats avec ceux obtenus en faisant agir l'acide sulfureux sur la cystine ou le glutathion oxydé, on constate deux particularités.

a) La réaction se produit à pH 2,8 avec l'insuline, ce qui suggère que SO_3H^- peut intervenir alors que les disulfures simples ne réagissent qu'avec So_3^- jusqu'à un pH voisin de 9.

b) Alors que les disulfures réagissent entièrement avec SO_3^-, les liaisons disulfures de l'insuline semblent subir l'influence des fonctions qui les entourent et la réaction ne peut être complète qu'en présence d'un agent de précipitation des thiols. En particulier, la proximité de charges négatives dues à l'ionisation du groupement carboxyle diminue la vitesse de réaction des liaisons disulfures (14).

La réaction du sulfite sur l'insuline se produit facilement. Elle a été réalisée dans les conditions suivantes par MICHEEL et EMDE (61.) A 90 mg d'insuline cristallisée dissous dans 2 ml d'eau, on ajoute 5 ml d'une solution d'acide sulfureux à 5. p. 100 et on laisse trois jours en contact. La solution est séchée dans un dessiccateur, reprise dans l'eau et privée de sulfate et de sulfite par addition d'acétate de baryum. Après un nouveau séchage par le vide, il reste 34 mg de produit insoluble A et une fraction soluble B.

Si l'on fait réagir l'insuline sur le bisulfite à pH 4,5 on obtient davantage de produit insoluble. L'hydrolyse acide de ces produits ne libère pas de l'acide sulfureux, mais de l'acide sulfurique comme le S-cystéine sulfonate.

		SO_2 dégagé pendant l'hydrolyse	SO_4 dans le résidu % S
Insuline pH : 2	B soluble ...	0	0,18
	A insoluble..	0	0,69
Insuline pH : 4,5	A insoluble..	0	1,06

Les diverses études faites sur l'insuline sont donc concordantes : elles montrent que la réaction du sulfite sur ce polypeptide est bien une réaction de Clarke, un peu compliquée par les structures qui entourent les liaisons disulfures et modifient leur aptitude à réagir.

b) **Le venin de serpent.**

La neurotoxine purifiée du venin de *Naja tripudians* est inactivée par le sulfite. Cette constatation avait été expliquée par SLOTTA (75) comme le résultat d'une réaction de Clarke. Mais MICHEEL et EMDE (61) ont montré que l'inactivation est d'autant plus forte que le milieu est plus acide, alors que la réaction de Clarke se produit d'autant mieux que le milieu est plus alcalin. La toxine n'est pas inactivée par l'acide sulfhydrique, la cystéine ou le glutathion comme l'insuline.

Comme avec les autres peptides et protéines déjà étudiés, on retrouve avec la neurotoxine, un produit insoluble de poids moléculaire élevé, en quantité d'autant plus importante que le pH augmente de 2 à 6. En même temps, il se forme d'autant plus de sulfate dans le résidu d'hydrolyse du produit insoluble. Ces modifications sont encore explicables par la rup-

ture des liaisons disulfures. Il se forme aussi le sel de sodium d'un produit soluble de faible poids moléculaire (59) (60).

La substance insoluble, obtenue par action de l'acide sulfureux sur la neurotoxine, présente une particularité, celle de redonner, à l'hydrolyse, de l'acide sulfureux en quantité importante par rapport au sulfate produit. Cette particularité n'a été retrouvée dans aucun des autres composés étudiés. Il est donc évident que le mode de liaison du sulfite n'est pas le même dans la neurotoxine et dans le S-cystéine sulfonate. Le fait que la neurotoxine soit si facilement inactivée par le sulfite en milieu acide, conduit à l'hypothèse que le sulfite doit se combiner au groupement prosthétique.

La conclusion de ces études est que l'acide sulfureux peut donner avec les polypeptides une réaction différente de celle étudiée par CLARKE. Sur le mode de liaison, on ne peut jusqu'ici faire que des hypothèses. S'il s'agit d'une fonction acide sulfonique, la liaison entre le soufre et le carbone doit être influencée par un groupement voisin, comme c'est le cas pour les acides α-hydroxy sulfoniques ou combinaisons bisulfitiques. Ces composés sont en effet beaucoup moins stables que les acides sulfoniques n'ayant pas de fonction hydroxyle en position α. Selon MICHEEL et BODE (60) il est vraisemblable, mais pas certain, que l'acide sulfureux réagit sur un groupement contenant déjà du soufre.

c) **La laine.**

La réaction des sulfites sur la laine présente un intérêt économique considérable puisqu'ils sont utilisés :

a) Dans le blanchiment.

b) Dans le bain antichlore qui suit le traitement aux halogènes ayant pour but de rendre la laine irrétrécissable.

c) Dans le bain qui suit le traitement au permanganate (blanchiment et diminution du feutrage).

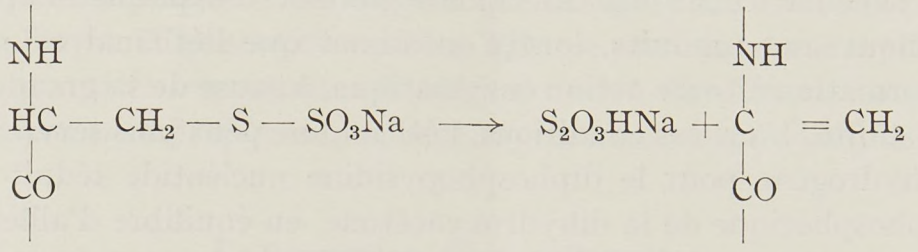
Il a été vérifié que ces traitements doux sont sans action sur les liaisons disulfures (1).

Il n'en est plus de même avec un traitement plus énergique : par exemple un trempage de 17 heures dans une solution de sulfite à 3 p. 100 à divers pH. On observe alors la réaction de Clarke, qui est mesurée après hydrolyse, aussi bien par la détermination des fonctions thiols libérées que du S-cystéine sulfonate formé. Appliquant cette technique, ELSWORTH et PHILLIPS (25), ont constaté que le pH optimum de la réaction se situe à 5 et ils concluent que seuls les ions SO_3H^- interviennent dans la réaction, qu'ils décomposent ainsi :

$$R-S-S-R + H_2O \longrightarrow R-SH + R-SOH$$
$$RSOH + SO_3H^- \rightleftarrows R-S-SO_3^- + H_2O$$

Toutes les liaisons disulfures de la laine ne réagissent pas. Dans les meilleures conditions seulement les 2/3 réagissent.

Par réaction prolongée à haute température, le groupement S-cystéine sulfonate peut se décomposer en faisant apparaître un résidu aminoacrylique (26).



Le comportement de la kératine des cheveux envers le sulfite est analogue à celui de la laine (78).

Ces études montrent que la réaction découverte par CLARKE est très générale. On la retrouve avec tous les corps possédant une liaison disulfure, et elle se produit même avec des corps insolubles comme la laine. Des divergences subsistent cependant pour expliquer le mode d'action des sulfites. Pour SPEAKMAN (78), CECIL et LOENING (13), MC PHEE (57) la réaction est due aux ions SO_3^{--} ; au contraire pour ELSWORTH et PHILLIPS (25) ce sont les ions SO_3^- qui réagissent.

III. — Inhibition des réactions enzymatiques par l'acide sulfureux.

L'action de l'acide sulfureux comme inhibiteur de réactions enzymatiques a reçu de nombreuses applications pratiques que nous avons déjà signalées. En revanche, il est rarement utilisé dans les travaux d'enzymologie, et il n'est pas habituellement cité dans les listes d'inhibiteurs. Il est cependant possible de retrouver dans la littérature un petit nombre d'études dans lesquelles le sulfite a été employé comme inhibiteur de réactions enzymatiques. Nous nous proposons de faire une analyse de ces travaux, en les répartissant en trois groupes d'après son mode d'action. Dans les fermentations déviées, il intervient par suite de sa combinaison avec un composé intermédiaire, aldéhydique ou cétonique. L'inhibition peut aussi être due à la formation de sulfonates et enfin à une combinaison avec le diphosphopyridine nucléotide.

a) Fermentations déviées.

Le premier exemple de l'inhibition d'une fermentation par le sulfite est rapporté par NEUBERG et REINFÜRTH (64). La levure mise en présence de sucre et de bisulfite ne produit pas d'éthanol, mais donne du glycérol

et de l'éthane α-hydroxysulfonate de sodium dans les proportions indiquées par la formule suivante :

$$C_6H_{12}O_6 \xrightarrow{SO_3Na_2 + H_2O} CH_3 - CH(OH) - SO_3Na + CO_3HNa + CH_2OH - CHOH - CH_2OH$$

Le schéma d'Embden Meyerhof permet d'expliquer l'apparition de ces nouveaux produits, lorsqu'on admet que l'éthanal est soustrait dès sa formation à toute action enzymatique, à cause de sa grande affinité pour le sulfite. Dans ces conditions, l'éthanal ne peut plus servir d'accepteur d'hydrogène pour le diphosphopyridine nucléotide réduit et c'est l'ester phosphorique de la dihydroxyacétone, en équilibre d'ailleurs avec le 3-phosphoglycéraldéhyde qui est réduit à sa place et donne naissance au glycérol.

Cette réaction se produit à pH neutre, sans multiplication des levures. D'après Underkofler (84), la réaction cesse lorsque le pH est inférieur à 6,5, par suite de la toxicité du sulfite. Les expériences de Freedman et Donald (30) montrent que l'action défavorable du sulfite se manifeste sur la croissance, la vitesse de fermentation et le temps de survie des levures, d'autant plus intensément que le milieu est plus acide. Il apparaît donc que le sulfite n'agit pas uniquement par le mécanisme enzymatique que nous avons indiqué, mais inhibe aussi la plupart des activités de la levure.

Avec les bactéries acétiques Neuberg et Nord (63) sont parvenus à transformer l'éthanol en éthanal en effectuant la fermentation en présence de sulfite de Ca, dans un milieu proche de la neutralité.

Dans une étude consacrée à la décarboxylase de l'acide pyruvique, Wallerstein et Stern (87) constatent que cette réaction enzymatique peut être inhibée par le sulfite. L'inhibition est très forte à pH = 6,2 à condition que le sulfite soit stœchiométriquement en excès par rapport au pyruvate ; elle est indépendante de l'état de pureté et de dispersion de l'enzyme ; elle peut être réduite en ajoutant un excès de pyruvate et non pas en ajoutant de la carboxylase ou de la cocarboxylase. Il apparaît clairement que l'inhibition est due à la formation d'un composé d'addition entre le sulfite et l'acide pyruvique, ce composé n'étant pas décarboxylé par l'enzyme. Dans les conditions où ont été faites les mesures, le sulfite n'intervient pas à la suite d'une action directe sur la protéine enzymatique ou la coenzyme ; son action est due à sa combinaison avec le substrat. Cette conclusion est importante car on connaît depuis longtemps le clivage par le sulfite de la thiamine, coenzyme de la carboxylase. Il était donc normal de se demander si l'inhibition n'était pas due précisément à cette réaction.

Zelitch (93) observe que la deshydrogénase de l'acide glyoxylique, dont l'activité est mesurée par oxydation du phosphopyridine nucléotide

réduit, est entièrement inhibée par le bisulfite à la concentration de 0,01 M. L'inhibition est levée par addition de glyoxylate à la même concentration, ce qui prouve bien qu'elle est due à la combinaison du sulfite avec le substrat.

Toutes les inhibitions qui relèvent de ce mode d'action présentent les particularités suivantes. Elles exigent que le sulfite soit en excès par rapport au substrat. Elles sont réversibles. Elles se produisent entre pH 6 et 7, avec des quantités importantes de sulfite, c'est-à-dire dans la zone où les combinaisons bisulfitiques se forment rapidement et sont peu dissociées.

b) **Formation d'un sulfonate.**

Il peut aussi se faire que le composé d'addition qui se forme entre le sulfite et le substrat ne soit pas dépourvu de toxicité pour l'enzyme. Un tel cas a été étudié par ZELITCH (93) sur un système enzymatique isolé des feuilles de tabac et capable de provoquer les réactions suivantes :

$$\text{Substrat} + \text{DPN}^+ \xrightarrow[\text{(deshydrogénase)}]{} \text{Substrat oxydé} + \text{DPNH} + \text{H}^+ \qquad (1)$$

$$\text{DPNH} + \text{CHO} - \text{COO}^- + \text{H}^+ \xrightarrow[\text{(deshydrogénase de l'acide glycolique)}]{} \text{DPN}^+ + \text{CH}_2\text{OH} - \text{COO}^- \qquad (2)$$

$$\text{CH}_2\text{OH} - \text{COO}^- + 1/2\ \text{O}_2 \xrightarrow[\text{(oxydase de l'acide glycolique)}]{} \text{CHO} - \text{COO}^- + \text{H}_2\text{O} \qquad (3)$$

La réaction (3) est inhibée à pH 8,3 par le sulfite et plusieurs composés bisulfitiques. A la concentration 5.10^{-5} M,

le bisulfite de sodium produit une inhibition de 57 p. 100 ;

le méthane α-hydroxy sulfonate de sodium, une inhibition de 62 p. 100 ;

l'éthane α-hydroxy sulfonate de sodium, une inhibition de 66 p. 100 ;

le sulfoglyoxylate de sodium, une inhibition de 67 p. 100.

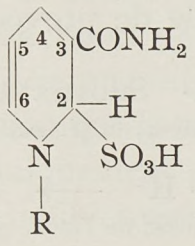
L'étude de cette inhibition montre qu'il y a compétition du substrat glycolate, avec l'inhibiteur hydroxysulfonate. La constante de MICHAELIS pour le glycolate est $3,8\ 10^{-4}$ M, alors que celle de l'inhibiteur est 1,7 à $1,9\ 10^{-6}$M. Le bisulfite de sodium n'est pas inhibiteur par lui-même, mais par l'intermédiaire de sa combinaison avec l'acideglyoxylique qui se forme. L'inhibition est indépendante du pH de 6,4 à 8,3. Les composés α-hydroxysulfoniques et les sulfites sont aussi actifs, à la même concentration, sur la deshydrogénase de l'acide lactique et, à concentration 10 fois plus forte, sur la deshydrogénase de l'acide d-glycérique.

Il faut noter qu'il s'agit là de deux enzymes à diphosphopyridine nucléotide et qu'on ne doit pas exclure une combinaison du sulfite avec ce coenzyme dans le genre de celles qui vont être décrites ci-dessous.

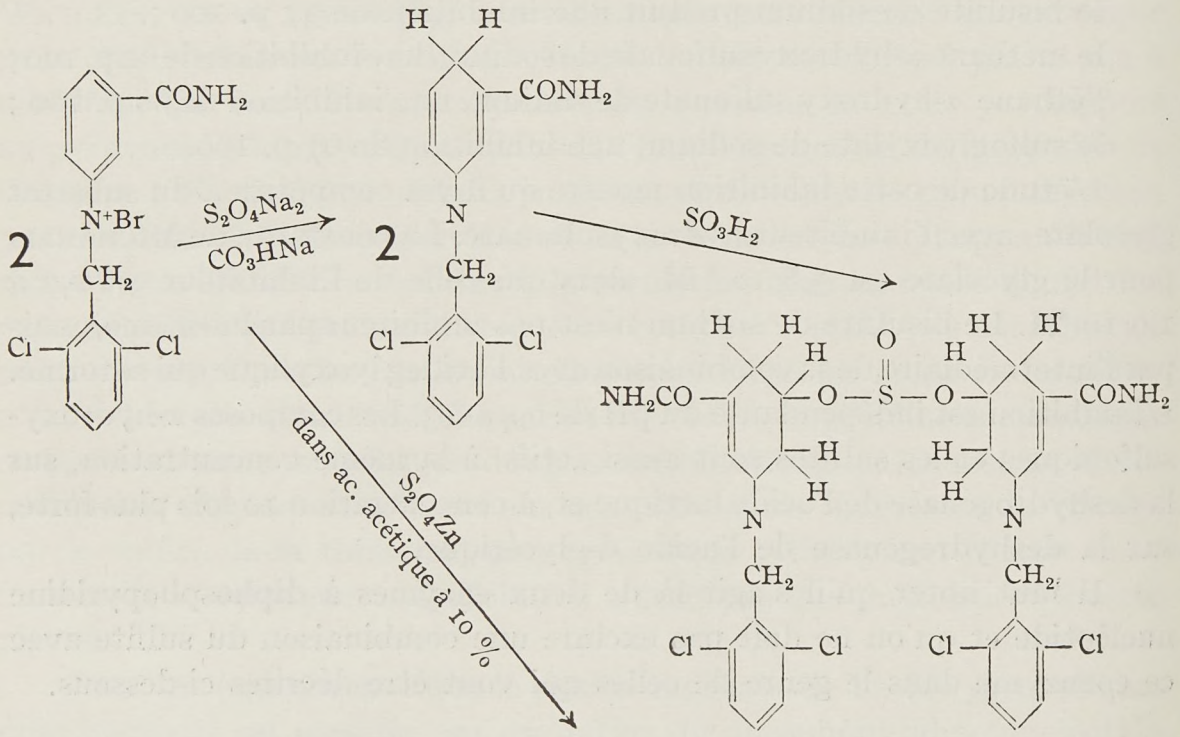
c) Combinaison du sulfite avec le diphosphopyridine nucléotide (DPN)

L'existence d'un composé d'addition entre le DPN et le sulfite est présumée depuis les observations spectrophotométriques de Hass (39). Cet auteur a montré en effet que le DPN réduit n'est pas stable en milieu acide à pH inférieur à 6, ce qui détermine sa perte d'activité comme donneur d'hydrogène et un déplacement du maximum d'absorption à 340 mμ vers des longueurs d'onde plus courtes. Si on utilise l'acide sulfureux à la place de l'acide chlorhydrique, il se forme un produit d'addition stable.

Meyerhof, Ohlmeyer et Mohle (58) indiquent aussi que le DPN réagit sur les sulfites pour donner un complexe ayant un spectre d'absorption ressemblant à celui du DPN réduit. D'après les mêmes auteurs, la structure suivante a été proposée par Kuhn.



Wallenfels et Schüly (86) travaillant avec un analogue du DPN, le bromhydrate de dichlorobenzyl nicotinamide, ont pu obtenir, en faisant agir le sulfite sur le produit préalablement réduit, un corps cristallisé qui correspondrait à la formule suivante :



La structure est déduite de l'analogie du spectre de ce produit d'addition avec celui de l'ester éthylique de l'acide 1,4, 5,6 tetrahydro N_1 methyl nicotinique. Ce qui mène les auteurs à conclure à l'identité des chromophores dans les deux molécules ($> N - CH = CH - \underset{\underset{O}{\|}}{C} -$).

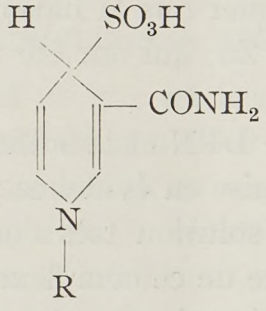
PFLEIDERER, JECKEL et WIELAND (68) ont constaté que la deshydrogénase de l'acide lactique extraite du cœur de porc est inhibée par les préparations de DPN réduites avec le dithionite, et ils ont rapporté ce phénomène à la présence de sulfite. A pH 7,2 ils obtiennent avec des produits cristallisés 50 p. 100 d'inhibition pour une concentration en sulfite de 5 μg/ml. L'inhibition s'observe dans les deux sens de réaction,

$$CH_3 - CO - COOH + DPNH + H^+ \underset{2}{\overset{1}{\rightleftarrows}} CH_3 - CHOH - COOH + DPN$$

alors que ZELITCH (93) n'avait constaté d'inhibition que pour la réaction (2).

L'inhibition augmente en même temps que la concentration en DPN oxydé. Cette observation a conduit les auteurs à rechercher s'il n'existe pas un composé d'addition entre ces deux produits.

En milieu dilué, il ne leur a pas été possible de mettre en évidence, même par spectrophotométrie, une combinaison, par suite de sa dissociation très importante. Mais si l'on ajoute à une solution diluée de DPN et de sulfite des quantités croissantes de deshydrogénase de l'acide lactique, il se produit une très nette augmentation de l'absorption à 320 mμ, qui dans une large mesure est proportionnelle à la quantité de protéine ajoutée. Le phénomène ne se retrouve plus si on ajoute au mélange une protéine non enzymatique. Les auteurs expliquent ce qui précède en admettant que le sulfite donne un produit d'addition avec le DPN oxydé qui est stabilisé par sa fixation sur la protéine. Ils proposent la structure suivante :



où le sulfite est fixé en position 4. L'affinité de ce composé pour la protéine serait extrêmement forte. Le sulfite peut cependant être partiellement éliminé par une dialyse prolongée et l'inhibition diminue à la suite d'une dilution.

En ajoutant des quantités croissantes de DPN et de sulfite à une

solution pure d'enzyme, il est possible de déterminer les molécules de DPN liées à une molécule d'enzyme.

Le cyanure et l'hydroxylamine ne donnent pas des modifications spectroscopiques analogues en présence d'enzyme, ce qui correspond bien au fait qu'ils ne sont pas inhibiteurs pour la deshydrogénase de l'acide lactique.

Le sulfite inhibe dans les mêmes conditions la deshydrogénase de l'acide malique, et à un degré moindre, les deshydrogénases de l'acide glutamique et de l'acide glycérophosphorique, ainsi que la deshydrogénase de l'éthanol extraite du foie. Au contraire, la deshydrogénase de l'éthanol extraite de la levure est entièrement insensible à cet inhibiteur. Une explication du comportement différent des deux deshydrogénases de l'éthanol est proposée par WALLENFELS et SCHULY (86). Le sulfite ne pouvant se fixer que sur le DPN réduit, déjà combiné à la protéine, on conçoit qu'il soit peu inhibiteur pour les enzymes dont la combinaison avec le DPN réduit est très dissociée : c'est justement le cas de la deshydrogénase de l'éthanol extraite de la levure.

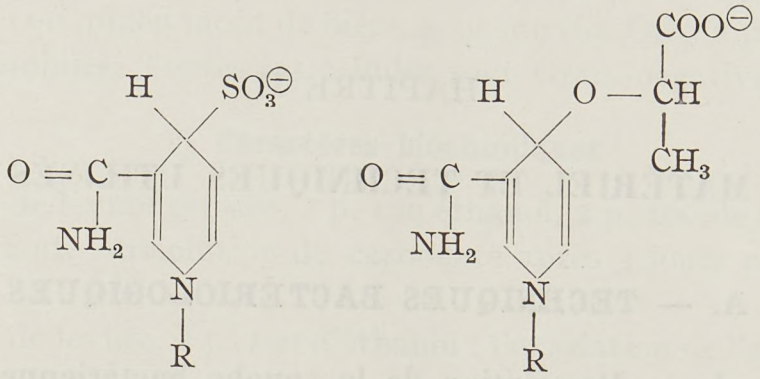
La sensibilité de ces diverses deshydrogénases peut, d'après ces auteurs, fournir une explication des propriétés désinfectantes de l'acide sulfureux. Un fait est cependant troublant, les propriétés désinfectantes apparaissent en milieu acide, alors que l'inhibition des deshydrogénases se produit très fortement en milieu neutre, sans que les auteurs aient remarqué une influence du pH.

TERAYAMA et VESTLING (83) ont aussi confirmé, que la deshydrogénase de l'acide lactique extraite du foie est fortement inhibée par les sulfites et les sulfures. L'absorption maximum à 320 mμ s'observe lorsqu'on mélange les trois composés : DPN, sulfure et enzyme. Les auteurs apportent un fait nouveau particulièrement important, c'est que le maximum d'absorption du mélange précédent disparaît lorsqu'on y ajoute un produit complexant tel que l'acide éthylène diamine tétracétique. Ceci laisse donc présumer que la liaison enzyme, DPN, inhibiteur fait intervenir les atomes de Zn, qui ont été mis en évidence dans beaucoup de deshydrogénases.

La combinaison entre le DPN et le sulfite se produit même en l'absence d'enzyme. Elle a été mise en évidence par COLOWICK, KAPLAN et CIOTTI (17) en faisant une solution très concentrée de sulfite. Le pH le plus favorable à l'existence de ce complexe est voisin de la neutralité. Lorsqu'on s'en écarte, il se dissocie en redonnant du DPN libre, que l'on a pu mettre en évidence par l'addition de cyanure.

L'existence d'une combinaison enzyme-DPN-sulfite est confirmée par la protection particulièrement efficace qu'exerce le mélange DPN-sulfite sur la dénaturation de la deshydrogénase de l'acide lactique. Comme dans ce phénomène le sulfite se montre compétitif avec le lactate,

PFLEIDERER, JECKEL et WIELAND (68) admettent qu'ils se fixent tous les deux au même endroit sur la molécule du DPN de la façon suivante :



Ces diverses études montrent qu'il existe une combinaison entre le sulfite et le DPN, mais les auteurs ne sont pas d'accord pour savoir si la combinaison a lieu avec le produit réduit ou avec le produit oxydé. La grande ressemblance qui existe entre le spectre DPN réduit et celui du DPN combiné au sulfite, suggère que le produit d'addition doit avoir la structure du DPN réduit, ce qui est en faveur de l'opinion exprimée par WALLENFELS et SCHÜLY. En revanche, il est difficile d'admettre avec PFLEIDERER, JECKEL et WIELAND que le produit formé possède la structure d'un sulfonate. En effet, une telle liaison est extrêmement stable et le sulfite ne pourrait être détaché par une dialyse même prolongée. Malgré les divers arguments proposés, il n'est pas possible de décider si la liaison se fait sur le carbone 2,4 ou 5 du noyau pyridine. Malgré ces incertitudes sur la structure de ce composé d'addition, il est indiscutable que le sulfite doit être considéré comme un inhibiteur de certaines enzymes à DPN.

Une étude de SCARDOVI (70 *bis*) rapporte l'action inhibitrice du sulfite sur l'oxydation de l'acétate par *Saccharomyces cerevisiae*. La réaction suivante :

Acide acétique + ATP + CoA →
Acetyl CoA + AMP + Acide pyrophosphorique

réalisée avec un extrait à pH = 7,4 est inhibée à 50 p. 100 par l'acide sulfureux, lorsque sa concentration atteint 10 µ mole/ml. Le taux de l'inhibition peut être diminué lorsqu'on augmente la concentration en coenzyme A. L'étude cinétique de la réaction montre qu'il existe une combinaison entre coenzyme et inhibiteur. C'est, à notre connaissance, la seule réaction étudiée où le sulfite se révèle comme inhibiteur d'un système faisant intervenir la coenzyme A.

CHAPITRE II

MATÉRIEL ET TECHNIQUES UTILISÉS

A. — TECHNIQUES BACTÉRIOLOGIQUES

I. — Description de la souche bactérienne.

Parmi les bactéries acétiques que nous avons isolées du vin, nous avons choisi pour cette étude une souche particulièrement vigoureuse et dont la culture n'offrait pas de difficultés. L'isolement a été réalisé à partir d'un vin rouge par étalement sur milieu gélosé constitué par du vin dilué au demi. Depuis 1951, cette souche était entretenue au laboratoire par des repiquages successifs sur un milieu moût de bière gélosé additionné de 2 p. 100 d'éthanol.

Pour la détermination de l'espèce, on a utilisé les tests proposés par Frateur (29). Nous avons aussi fait quelques autres tests, qui ont servi à préciser la description de la souche, mais dont il n'a pas été tenu compte pour la détermination.

a) Caractères morphologiques.

Culture en strie sur moût de bière gélosé à 2 p. 100 d'éthanol : après 8 jours, strie crème, brillante, plate à bords droits. Consistance visqueuse mais ne coulant pas. Pas de production de pigments.

Culture sur moût de bière liquide à 2 p. 100 d'éthanol : après 8 jours liquide trouble, dépôt abondant. En surface fragments de voile blanchâtre peu cohérent.

Sur eau de levure à 2 p. 100 de glycérol, pas de croissance, pas de dioxyacétone.

Sur eau de levure à 2 p. 100 de mannitol, même aspect.

Sur eau de levure à 2 p. 100 de butanediol, trouble important et pas de voile, production d'acétoïne.

Sur vin de 8°, voile blanchâtre assez épais, vin clair au début de la croissance ; après 8 jours les morceaux de voile tombent au fond du tube mais le vin reste clair.

Colonie géante sur moût de bière gélatiné : après 1 mois à 18°, colonie homogène, luisante, visqueuse. Forme circulaire, diamètre 9 mm, plate, bords entiers. Pas de liquéfaction de la gélatine.

b) Caractères microscopiques.

Cellules le plus souvent groupées en diplobacilles trapus. Épaisseur variant de 2μ en milieu moût de bière, à 1μ sur vin. On n'a jamais observé de cellules mobiles. Toutes les cellules sont Gram-négatives.

c) Caractères biochimiques.

Sur eau de levure gélosée, 2 p. 100 éthanol, 2 p. 100 de CO_3Ca : croissance importante, dissolution du carbonate après 3 jours mais pas d'irisation.

Sur eau de levure, 2 p. 100 d'éthanol : l'oxydation de l'acide acétique se produit après le 12e jour.

Sur eau de levure gélosée, 2 p. 100 de lactate de calcium : croissance importante et formation de cristaux de carbonate, le long de la culture.

Sur eau de levure gélosée, 2 p. 100 de glucose, 2 p. 100 de CO_3Ca, croissance médiocre, production d'acide gluconique mise en évidence par la dissolution du carbonate. Bactérie produisant de la catalase sur ce milieu de culture.

Sur eau de levure gélosée, 2 p. 100 saccharose, 2 p. 100 de CO_3Ca, croissance faible, pas de production d'acide ni de pigments.

Sur milieu de Hoyer, modifié selon FRATEUR : pas de croissance.

Sur eau de levure gélosée + 2 p. 100 de glycérol : pas de croissance.

Sur eau de levure gélosée + 2 p. 100 de mannitol : pas de croissance.

Certaines propriétés biochimiques ont été confirmées par la technique des oxydogrammes. Elle consiste à déposer un amas de bactéries sur une plaque de Petri contenant la substance à oxyder dans de l'eau de levure gélosée. Après une incubation de quelques heures, se manifestent des réactions chimiques indépendamment de la croissance. Lorsque le substrat est du lactate de calcium, il apparaît dans la gélose, autour des bactéries, des cristaux de carbonate de calcium. Lorsque le milieu contient du glycérol ou du mannitol, les produits d'oxydation, dioxyacétone et lévulose, sont mis en évidence, en recouvrant la plaque de liqueur de Fehling, par l'apparition d'une coloration rouge. Dans le cas d'éthanol se transformant en acide, on ajoute à la gélose du carbonate de calcium avant de la couler : la réaction est alors indiquée par sa dissolution.

Les bactéries nécessaires à ces tests ont été prélevées sur moût de bière gélosé 2 p. 100 d'éthanol. Elles n'ont pas subi de lavage.

Avec le lactate de calcium, formation de précipité après 1 jour.

Avec le glucose, formation d'acide après 3 jours.

Avec le 2-3 butanediol, formation de substance réductrice après 6 heures.

Avec le glycérol, faible formation de substance réductrice après 6 heures.

Avec le mannitol, faible formation de substance réductrice après 6 heures.

Ces caractères, lorsqu'on consulte la clef dichotomique de FRATEUR, conduisent à identifier cette souche à *A. rancens* variété *vini* (Beijerinck); c'est une espèce que nous avons souvent rencontrée dans le vin, et qui est bien typique du groupe « oxydans », c'est-à-dire des bactéries possédant des propriétés oxydantes brutales sur les alcools primaires, mais à peu près sans action sur les alcools secondaires.

II. — Conditions de culture.

Les conditions de culture ont été définies d'une façon aussi précise que possible pour obtenir des bactéries possédant des caractéristiques très voisines d'une récolte à l'autre. Parmi tous les milieux utilisables, on a donné la préférence à celui qui permet un développement suffisamment rapide dans des conditions assez proches de celles que les *Acetobacter* rencontrent dans la nature. Comme aliment carboné on a utilisé l'éthanol, de façon à ce que la croissance se fasse avec le même substrat que celui dont on étudiera l'oxydation. On a choisi un milieu acide puisque c'est un des principaux caractères des bactéries acétiques de pouvoir se développer malgré un pH bas. Une propriété assez générale des *Acetobacter* est que certaines souches deviennent incapables de transformer l'acide acétique en gaz carbonique et en eau lorsqu'elles ont été cultivées à un pH acide. Notre souche est bien dans ce cas. L'emploi de la méthode micromanométrique de Warburg en sera donc facilité puisqu'il n'y aura pas à tenir compte du gaz carbonique dégagé par cette réaction. La potasse que l'on introduit dans les fioles ne sert alors qu'à fixer la faible quantité de gaz carbonique produite par la respiration endogène. Les recherches poursuivies par HROMATKA (40 *bis*) avec du carbone 14, ont montré que le gaz carbonique peut être assimilé par les bactéries acétiques pendant leur croissance, mais qu'il ne prend aucune part à la transformation de l'éthanol en acide acétique. On peut donc penser que les mesures d'oxydation de l'éthanol faites dans l'appareil de Warburg avec des bactéries non proliférantes, ne sont pas influencées par la présence ou l'absence de gaz carbonique.

a) Milieu de culture.

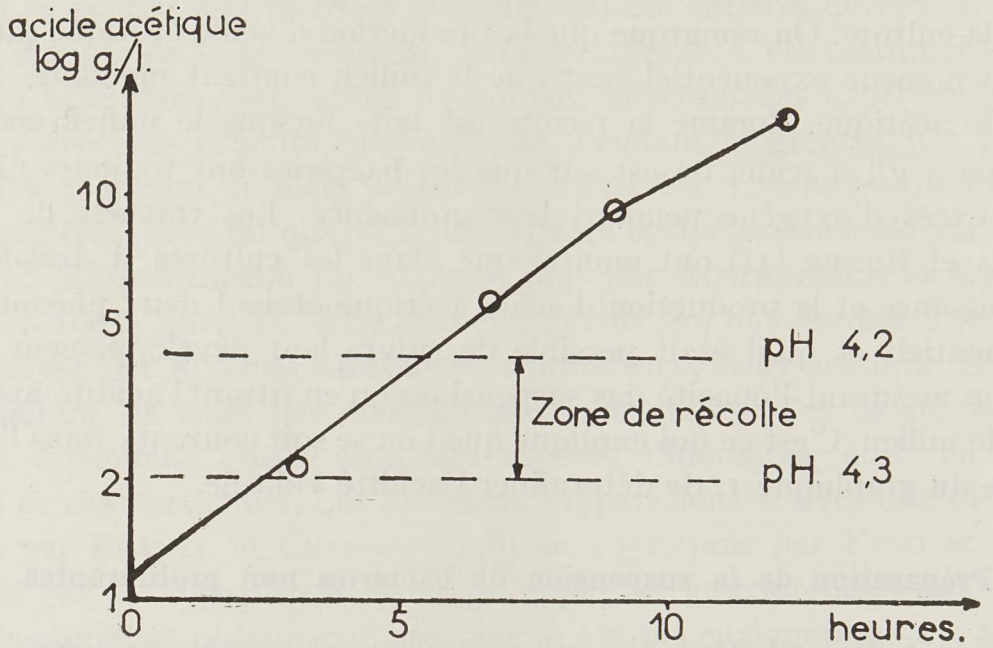
Le milieu choisi a la composition suivante :

Tartrate de sodium et potassium, 4 H_2O	22,6 g.
Acide phosphorique 0,2 M	40 ml.
Extrait de levure Difco	3 g.
Extrait de bœuf Difco	3 g.
Solution de sels minéraux Wright et Sheggs	5 ml.
quantité suffisante pour 1 litre.	

Solution de SKEGGS et WRIGHT (74) : $SO_4Mg, 7H_2O$ 40 g, $SO_4Mn, 4H_2O$ 2 g, $FeCl^3$ anhydre 0,4 g HCl pur 1 ml. Quantité suffisante pour 1 litre.

Le pH du milieu est égal à 4, 5 ou voisin de ce chiffre auquel il est ajusté. On stérilise à 110° pendant 20 minutes et l'éthanol est ajouté ensuite à la concentration de 2 p. 100.

On a introduit une source d'azote importante de façon à obtenir une croissance rapide et à pouvoir récolter les microbes après 24 heures de culture. Un pouvoir tampon suffisant est assuré par le mélange tartrate double de sodium potassium, et acide phosphorique. Le choix s'est porté sur l'acide tartrique dont le p $k_2 = 4,16$ convient bien dans la zone de pH qui nous intéresse. Il s'agit d'autre part d'un corps qui n'est pas



GRAPHIQUE 1. — Production d'acide acétique dans une culture agitée d'*A. rancens*. Les conditions sont indiquées dans le texte.

facilement métabolisé par les bactéries et qui n'est donc pas susceptible d'apporter une perturbation dans le métabolisme de l'éthanol. Comme les travaux de JACOBSOHN et AZEVIDO (44) ont montré que *A. rancens* peut, après une adaptation, fermenter le (+) tartrate, nous avons vérifié que, dans les conditions où nous avons réalisé la culture, cette souche est incapable de l'oxyder ou de le décarboxyler. C'est cette raison qui a fait préférer le tartrate à l'acétate, citrate, succinate ou malate.

Un inconvénient des tampons contenant du tartrate est qu'on ne peut les utiliser qu'à faible concentration, par suite du peu de solubilité du tartrate acide de potassium qui tend à précipiter lorsque l'acidité augmente. Pour le milieu que nous utilisons, la précipitation ne commencera qu'au-dessous de pH = 4,1. Comme le montre le graphique 1, l'efficacité du tampon est suffisante pour conserver un pH de 4,2 lorsque le milieu contient 4 g/l d'acide acétique.

b) **Réalisation de l'aérobiose.**

Les cultures ont été obtenues dans des fioles placées sur agitateur alternatif. Il s'agit de fioles d'Erlenmeyer de 1 litre, à grande ouverture, chacune contenant 100 ml de milieu. La fermeture est constituée par une mince couche de coton maintenue entre deux nappes de gaze. L'ensemble est tendu sur le goulot de la fiole par une bague de caoutchouc. L'agitateur utilisé donne 120 aller et retour par minute et une amplitude de déplacement de 7 cm. Le système de fermeture adopté est bien supérieur à celui du bouchage au coton, car il permet une excellente diffusion de l'oxygène. On peut voir en effet, sur le graphique 1, que le métabolisme des bactéries n'est pas limité par un manque d'oxygène dans la culture. On remarque que la production d'acide acétique est bien un phénomène exponentiel tant que le milieu contient moins de 10 g/l d'acide acétique. Comme la récolte est faite lorsque le milieu contient environ 4 g/l d'acide, on est sûr que les bactéries ont toujours disposé d'un excès d'oxygène pendant leur croissance. Les travaux de Hromatka et Ebner (41) ont montré que, dans les cultures d'*Acetobacter*, la croissance et la production d'acide acétique étaient deux phénomènes exponentiels et qu'il était possible de suivre leur développement aussi bien en mesurant l'opacité des suspensions qu'en titrant l'acidité apparue dans le milieu. C'est ce qui explique que l'on se soit contenté, dans l'expérience du graphique 1, de déterminer l'acidité volatile.

c) **Préparation de la suspension de bactéries non proliférantes.**

Une fiole contenant 100 ml du milieu est ensemencée avec 0,2 à 0,4 ml d'une préculture faite sur le même milieu. Après 16 heures d'agitation à 24°C on a atteint une concentration en acide acétique de 2 à 4 g/l. Le pH est descendu entre 4,2 et 4,3 et la culture se trouve encore en phase exponentielle de croissance.

A ce moment la fiole est refroidie dans la glace fondante en maintenant l'agitation, le liquide centrifugé 10 minutes à 3 000 g, le culot lavé une fois avec son volume d'eau glacée, lavé une seconde fois en amenant le pH du milieu à 6 avec de la soude 0,01 N, pH contrôlé avec du papier indicateur. Après centrifugation, ces bactéries sont remises en suspension dans un volume d'eau approprié à l'importance de la récolte. Elles sont conservées sur la glace fondante et utilisées dans les 4 heures qui suivent.

Pour obtenir des suspensions bactériennes actives, il est indispensable d'éviter que les bactéries ne manquent d'oxygène au moment de la récolte. C'est la raison pour laquelle il faut continuer à saturer d'air le milieu pendant qu'on le refroidit. Au voisinage de zéro degré, la consommation d'oxygène est suffisamment faible pour qu'on puisse cen-

trifuger. On sait en effet, que les bactéries acétiques meurent rapidement lorsque dans un milieu acide contenant un substrat, elles viennent à manquer d'oxygène (42).

Les bactéries, après leur premier lavage, continuent à acidifier l'eau dans laquelle on les remet en suspension. De plus, elles se présentent sous une forme floculée qui rend difficile un lavage plus complet et qui empêche de les répartir avec précision au cours des expériences. C'est la raison pour laquelle on relève le pH au cours du second lavage, ce traitement dispersant instantanément les bactéries.

d) **Préparation d'un extrait enzymatique.**

Les expériences réalisées avec des cellules entières doivent toujours tenir compte de la perméabilité de la membrane. C'est pourquoi il nous a paru utile dans cette étude de pouvoir effectuer des expériences analogues avec des extraits enzymatiques. Pendant longtemps, il a été impossible d'obtenir de telles préparations avec les *Acetobacter*. Le broyage des bactéries avec du quartz avait déjà été essayé sans succès par BUCHNER et MEISENHEIMER (9) en 1903, puis par ROTHENBACH et EBERLIN (70) en 1905. En 1928, WIELAND et BERTHO (89) ont cherché à produire l'autolyse par diverses substances, chloroforme, éther acétique, chlorure de sodium, et aussi par congélation des bactéries. Ces techniques, qui avait cependant réussi pour des espèces différentes, était en échec dans ce cas particulier. Les premières préparations actives ont été obtenues par FRANZL et CHARGAFF (28) en 1951, puis par KING et CHELDELIN (50) en 1954. Nous avons pu appliquer un traitement analogue à nos bactéries et obtenir par broyage un extrait enzymatique qui présentait encore une activité importante.

L'agent de broyage est primordial dans cette opération. Nous avons obtenu les meilleurs résultats avec de la poudre de verre pyrex que nous avons préparée nous-même, dans un broyeur à boulets de porcelaine, à partir de morceaux nettoyés avec le plus grand soin. On a utilisé uniquement la partie passant au tamis 200. La poudre de pyrex que l'on trouve dans le commerce ne permet pas d'obtenir un extrait actif. Le lavage que nous lui avons fait subir, d'abord dans l'acide chlorhydrique, puis dans l'eau, ne modifie en rien ce résultat négatif.

Toutes les opérations qui suivent sont effectuées dans une chambre froide à 0° et en n'utilisant que du matériel déjà refroidi à cette température. La pâte de bactéries est placée dans un mortier de porcelaine, et on ajoute deux à trois fois son volume en poudre de verre pyrex, de façon à obtenir une pâte lisse qui se détache facilement des parois du récipient. On broie vigoureusement pendant 10 minutes en détachant à la spatule les parties qui restent adhérentes au pilon.

Le produit du broyage est extrait pendant 20 minutes, en remuant sous agitation douce, avec du tampon phosphate 0,05 M, pH 6, ou avec de l'eau distillée ramenée au même pH. On ajoute 30 ml d'eau par gramme de microbes (poids frais). Dans une première centrifugation de 10 minutes à 3 500 g on élimine un culot contenant la poudre de pyrex et les bactéries intactes. On obtient ainsi un extrait brut dans lequel on contrôle l'absence de cellules au microscope. Ceci constitue l'extrait brut qui est soumis à une centrifugation de 30 minutes à 25 000 g. On sépare le liquide surnageant que l'on désigne sous le nom d'extrait clair et un culot remis en suspension dans l'eau ou le tampon, qui constitue les granules L'examen de ces deux fractions au microscope électronique, après ombrage au palladium, montre que l'extrait clair contient encore des particules solides. Quant aux granules, ils sont constitués par des débris de tailles très diverses. On y reconnaît principalement des structures granulaires qui sont déjà visibles dans les cellules avant le broyage et surtout les membranes cellulaires qui conservent grossièrement la forme des bactéries.

Le tableau I donne un exemple de cette préparation et de l'activité qui subsiste dans les deux fractions.

TABLEAU I

*Préparation d'un extrait d'*A. rancens.

Fractions	Volume ml	N mg/ml	Poids sec mg/ml	Activité (1) µl O_2/h ml	Activité spécifique par mg poids sec
Suspension bactéries non proliférantes	100	2,18	24,8	16 000	645
Granules	33	0,72	8	1 600	200
Extrait clair.....	100	1,5	12	465	39

(1) Activité déterminée par la technique de Warburg. Atmosphère : air. Température 30° Cl. Mélange réactionnel : — Tampon Mc Ilvaine pH 3,8 concentration en PO_4 ≡ 0,035 M. — Éthanol. 0,05 M. — Bactéries 0,25 mg. Granules 0,8 mg. Extrait clair 12 mg, par fiole pour un volume final de 2,1 ml.

SMITH (76) a soumis à des centrifugations successives des extraits d'*Acetobacter* préparés dans des conditions identiques à celles que nous venons de décrire et a montré que l'activité oxydante se trouve presque uniquement localisée sur des particules solides de tailles très diverses. Il a été possible de les éliminer presque complètement au cours de centrifugations successives qui ont été poussées à 144 000 g pendant 2 heures. On a reconnu que ces particules étaient riches en cytochrome. L'extrait que nous avons préparé s'est comporté d'une façon analogue. Soumis à des centrifugations successives dans une centrifugeuse Servall développant 25 000 g et maintenue à 0°C, on a constaté que l'activité du

liquide surnageant diminue au fur et à mesure que baisse la teneur en protéines. Les résultats sont rapportés dans le tableau II.

TABLEAU II

Perte d'activité de l'extrait clair au cours de centrifugations successives.

Temps de centrifugation à 20 000 g	Protéines (1) en mg/ml	Activité (2) µl O_2/h.ml	Activité spécifique par mg de protéine
0 minute.....	10,9	1 986	182
15 —	—	1 666	—
45 —	—	1 370	—
60 —	6,6	1 200	182

(1) Dosage des protéines par spectrophotométrie U. V. selon Warburg et Christian (88).
(2) Activité déterminée par la technique de Warburg. Atmosphère air. Température 30° C. Mélange réactionnel : — Tampon phosphate pH 6 : 0,0033 M. Extrait clair 0,3 ml. Ethanol 0,01 M volume final 2,1 ml.

L'activité spécifique reste la même dans la préparation avant et après les centrifugations, alors que l'activité rapportée à un volume déterminé diminue. Ceci laisse donc supposer que l'activité oxydante vis-à-vis de l'éthanol se trouve liée au moins en partie à des particules, qui s'éliminent au cours de la centrifugation. Il n'est pas vraisemblable que l'activité se trouve localisée dans des granules de taille déterminée susceptibles d'être sédimentés en 1 heure à 20 000 g, car s'il en était ainsi, l'activité spécifique devrait diminuer dans le liquide centrifugé. On doit donc admettre que l'activité enzymatique est associée à tous les débris cellulaires de tailles très diverses qui ne se sont pas solubilisés après le broyage des bactéries.

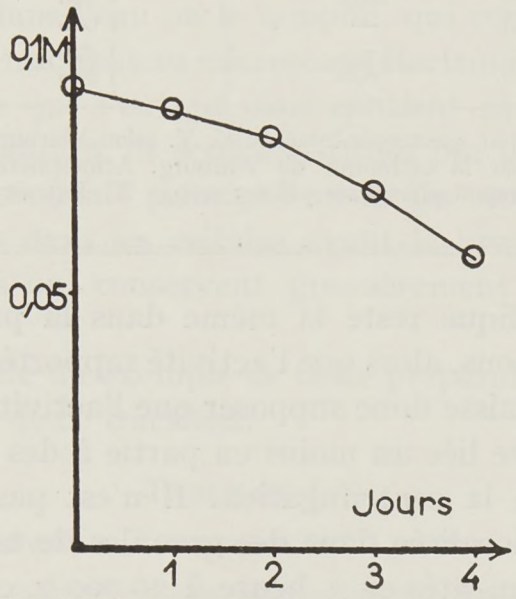
Le culot de centrifugation renfermant les débris contient au moins un pigment de nature hématinique. Nous avons pu disperser ce composé dans une solution de cholate de sodium à 0,8 p. 100. Après centrifugation, on a établi au spectrophotomètre le spectre de différence entre le pigment oxydé et le pigment réduit par addition de 5 µ mol/ml d'éthanol. On observe trois maximum situés à 442, 523, 554 mµ. Ceci indique la présence d'un pigment hématinique, que nous considérons, après SMITH, comme un cytochrome du groupe *b*. Il est intéressant de souligner que ce pigment n'a été observé jusqu'ici que chez les *Acetobacter*.

B. — TECHNIQUES CHIMIQUES

a) Dosage du sulfite.

Les solutions de sulfite utilisées au cours du travail ont été faites à partir du sulfite neutre de sodium cristallisé « Prolabo ». La solution de base de molarité 0,1 M est conservée dans une fiole bouchée à l'émeri

et renouvelée toutes les semaines. Avant l'emploi, le contenu de la fiole est homogénéisé par agitation. Afin d'éviter une diminution trop rapide du titre, les solutions et toutes les dilutions sont faites avec de l'eau déminéralisée par échangeurs d'ions, distillée dans du verre pyrex et bouillie avant l'emploi. Ces précautions ont pour but d'éviter la présence de catalyseurs d'oxydation, en particulier de cuivre et d'oxygène dissous. Le titre de la solution stock varie irrégulièrement d'un jour à l'autre, comme le montre le graphique 2. Il est donc nécessaire de le déterminer avant l'emploi.



GRAPHIQUE 2. — Diminution dans le temps du titre d'une solution 0,1 M de sulfite de sodium.

Les solutions, où l'on a été amené à doser les sulfites, avaient des concentrations s'étendant de $2.\ 10^{-3}$ à $1.\ 10^{-4}$ M. Lorsque l'on pouvait disposer de prises d'essais importantes, 5 à 10 ml, le dosage s'est fait par iodométrie ; lorsque l'on était obligé d'opérer sur des prises plus faibles, cas du dosage dans les cupules de l'appareil de Warburg, on a choisi une méthode colorimétrique plus sensible.

MÉTHODE IODOMÉTRIQUE

En milieu très dilué, l'iode réagit quantitativement sur le sulfite et il est possible de le tirrer directement si l'on prend soin de respecter les conditions suivantes (21). La concentration en sulfite doit rester égale ou inférieure à $5.\ 10^{-4}$ M. Le milieu doit être acidifié par un acide fort afin d'éviter la réaction de l'iode sur l'acide sulfureux combiné. On doit maintenir une concentration en iodure de potassium de l'ordre de 1 p. 100 pour sensibiliser le virage de l'empois d'amidon.

Ces conditions sont remplies en utilisant les quantités suivantes :

Prise d'essai	5 ml.
Acide sulfurique N	1 ml.
Iodure de potassium à 10 %	1 ml.
Empois d'amidon à 5 p. 1000	1 ml.

L'iode 0,02 N est ajouté avec une microburette de Trevan susceptible de donner des volumes de 500 µl avec une erreur inférieure à 1 µl.

Après titrage du sulfite libre, la même prise d'essai peut servir à déterminer la partie combinée. Pour cela, le milieu est amené à pH 8 par addition de la quantité nécessaire de la solution alcaline de soude et de borate préconisée par JAULMES (45). Le pH est contrôlé par touches externes sur du papier pH. Dans ces conditions, le sulfite combiné se libère et peut être titré par une nouvelle addition d'iode. Le virage de l'empois d'amidon se fait en milieu alcalin avec un certain retard. Il est indispensable de faire un témoin sur une solution ne contenant pas de sulfite.

Cette méthode est aussi applicable en présence de corps microbiens, car on a vérifié que l'iode ne réagit pas rapidement sur les bactéries dans un milieu aussi acide. Cependant, comme il s'agit là d'un microdosage, nous avons fait un titrage à blanc sur un échantillon témoin ne contenant pas de sulfite. La valeur trouvée qui est toujours faible a été déduite de celle obtenue pour l'échantillon avec sulfite.

Méthode colorimétrique

La coloration produite par la réaction de Schiff a été rendue quantitative par GRANT (37). Cette méthode a été adoptée et convient bien pour des quantités de sulfite comprises entre 2-10µg, dans une prise d'essai de 1 ml. Dans les conditions décrites par GRANT, il est impossible d'utiliser une courbe d'étalonnage de l'appareil. En effet, l'intensité de la coloration dépend non seulement de la dose de sulfite dans la prise d'essai, mais aussi diminue rapidement avec l'âge du réactif utilisé. Les séries de dosages ont toujours comporté des échantillons de référence contenant des doses connues de sulfite, choisies de façon à encadrer les quantités à doser.

Étant donné que nous avons été amené à faire ces déterminations dans des milieux relativement simples et que de toute façon nous pouvions disposer comme témoin du même échantillon dépourvu de sulfite, nous les avons effectuées sans défécation préalable sur un échantillon simplement clarifié par centrifugation. A 4 ml de réactif préparé d'après GRANT, on ajoute une prise d'essai de 1 ml contenant 0 à 10 µg de sulfite. La coloration est mesurée après 5 minutes avec un écran sélectif de 550 mµ.

On a recherché l'influence que peut exercer sur ce dosage la présence de la combinaison éthanal bisulfite qui est susceptible de se trouver dans les milieux étudiés. A cet effet, on a réalisé des dosages en présence de sel sodique de la combinaison éthanal bisulfite (éthane hydroxysulfonate de sodium) synthétisé par la méthode de BUNTE (11). En solution ce composé se dissocie avec une constante d'équilibre égale à $2{,}4\ 10^{-6}$ selon KERP (49). Aux dilutions employées, il libère donc une quantité

de sulfite non négligeable qui influe sur le dosage. Il faut donc calculer dans chaque cas la partie dissociée. C'est ce que l'on a fait en utilisant le tableau donné à cet effet par CHARLOT et GAUGUIN (15). On obtient les valeurs suivantes pour les trois concentrations utilisées.

Concentration en combinaison éthanal bisulfite	% dissocié	SO_2 en µ g/ml libre	SO_2 en µ g/ml total
—	—	—	—
$0{,}5\ 10^{-4}$ M	18,5	0,59	3,2
$1{,}5\ 10^{-4}$ M	11,6	1,11	9,6
$3{,}5\ 10^{-4}$ M	7,8	1,75	22,4

TABLEAU III

Dosage du sulfite par la méthode de Grant en présence de combinaison bisulfitique.

SO_2 du sulfite en µ g/ml	6,48	6,48	6,48	6,48
Ethanal bisulfite de Na en µ g/ml	0	3,2	9,6	22,4
SO_2 provenant de la dissociation de l'éthanal bisulfite	0	0,59	1,11	1,75
SO_2 total	6,48	7,07	7,59	8,23
D° mesuré	0,306	0,345	0,390	0,447
SO_2 déduit de la mesure		7,31	8,26	9,48
Erreur en µ g SO_2 introduite par la présence de la combinaison bisulfitique		0,24	0,67	1,25
Erreur en %		3,4 %	8,8 %	15,2 %

On voit d'après le tableau III que la combinaison éthanal bisulfite perturbe le dosage. Dans la zone d'emploi de cette méthode, on a une erreur de 5 p. 100 lorsqu'il y a autant de sulfite sous forme combinée que sous forme libre.

TABLEAU IV

Oxydation du sulfite pendant la centrifugation.

N°	Traitement (1)	SO_2 en µg/ml	Pertes en %
1	Non centrifugé	5,33	
2	Centrifugé tube plein	5,16	3,2%
3	Centrifugé tube mi-plein	4,92	7,7%
4	Non centrifugé	3,98	
5	Centrifugé mi-plein	3,71	6,8%

(1) Solution de sulfite centrifugé 5 minutes à 4 000 g en tubes droits non bouchés, de 5 ml de capacité.

Comme ce dosage colorimétrique a été fait sur des échantillons soumis à une centrifugation, on a voulu vérifier dans quelle mesure cette opération pouvait produire un départ ou une oxydation du sulfite. L'expérience rapportée dans le paragraphe suivant donne des précisions sur ce point.

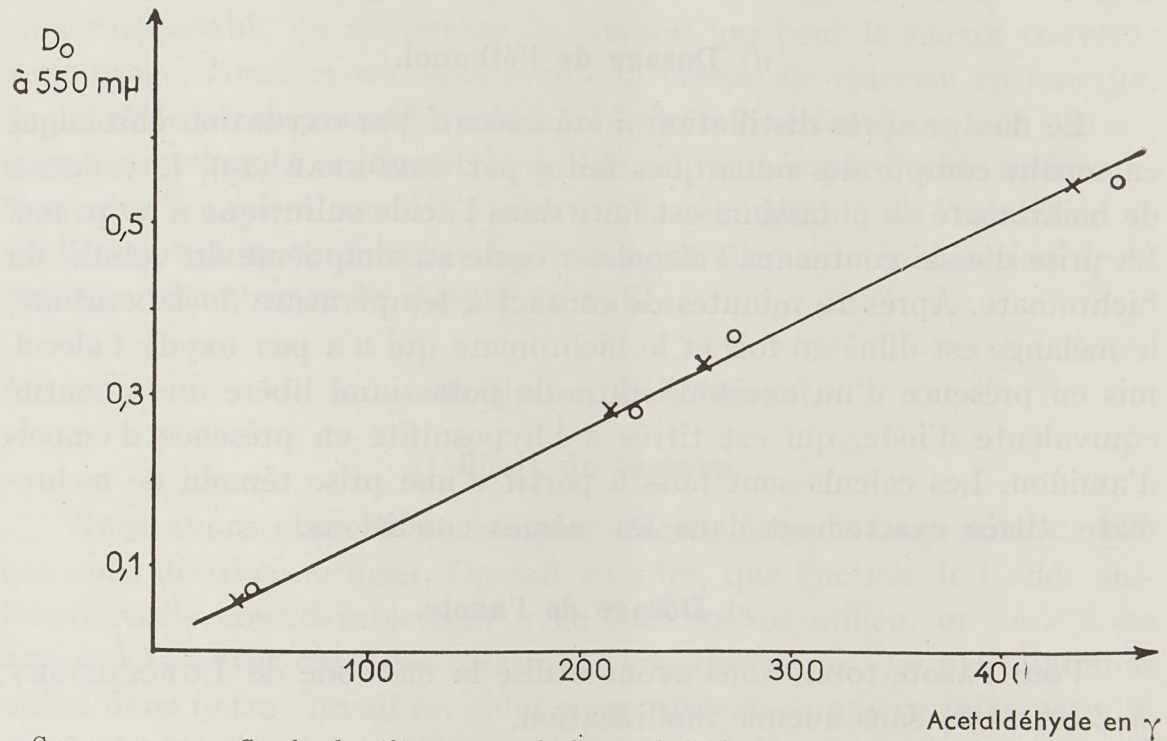
OXYDATION DU SULFITE PENDANT LES OPÉRATIONS DE CENTRIFUGATION

Le dosage iodométrique des sulfites peut se faire à la rigueur en présence de corps microbiens qui agissent seulement en diminuant un peu la netteté du point de virage de l'empois d'amidon. La méthode colorimétrique doit obligatoirement éliminer les bactéries. Les résultats du tableau IV qui se rapportent à deux solutions pures de sulfite, indiquent que la centrifugation ne produit que des pertes peu importantes, lorsqu'on a soin de remplir les tubes où on la réalise.

Il y aura cependant intérêt à faire subir dans tous les cas la même centrifugation aux échantillons de référence et aux essais afin de compenser les erreurs que cette opération peut occasionner.

b) **Dosage de l'éthanal.**

Les faibles concentrations d'éthanal qui peuvent se produire au cours de l'oxydation de l'éthanol en présence de sulfite ont été déterminées



GRAPHIQUE 3. — Courbe de référence pour le dosage de l'éthanal par la méthode de Fromageot et Heitz obtenue avec l'éthanal (×) et sa combinaison bisulfitique (o)

avec la méthode de FROMAGEOT et HEITZ (32) qui utilisent la réaction colorée de Rimini.

A 6 ml d'une solution contenant 60 à 400 μg d'éthanal, on ajoute 1,5 ml d'une solution saturée de pipérazine et 0,5 ml d'une solution de nitroprussiate de sodium à 4 p. 100. Après 2-3 minutes, la coloration bleue est maximum. Comme elle est instable on fait plusieurs mesures avec un filtre sélectif pour 560 mμ. On prend comme résultat la valeur de l'absorption maximum.

On a constaté que cette méthode dose à la fois l'éthanal libre et l'éthanal combiné au bisulfite.

Le graphique 3 représente deux courbes de références qui ont été construites à partir de solutions d'éthanal fraîchement distillé et de sel sodique de la combinaison bisulfitique et les résultats ont été identiques. Les deux solutions ont été normalisées par oxydation chromique avec la même méthode que celle exposée pour le dosage de l'éthanol.

c) Dosage de l'acide acétique.

Puisque les solutions ne contiennent que de l'acide acétique comme acide volatil, les dosages se font directement après entraînement à la vapeur d'eau, dans l'appareil décrit par JAULMES (45). Les prises d'essais peuvent varier de 1 à 20 ml suivant la teneur en acide. On titre par la soude 0,1 N en présence de phénolphtaléine. Pour une prise d'essai de 20 ml, il est nécessaire de recueillir 250 ml pour entraîner tout l'acide acétique. Pour 1 ml, il suffit d'en recueillir 50.

d) Dosage de l'éthanol.

Le dosage après distillation a été exécuté par oxydation chromique en tenant compte des remarques faites par CORDEBAR (19). La solution de bichromate de potassium est faite dans l'acide sulfurique à 50 p. 100. La prise d'essai contenant l'alcool est égale au cinquième du volume du bichromate. Après 10 minutes de contact à température du laboratoire, le mélange est dilué 20 fois et le bichromate qui n'a pas oxydé l'alcool, mis en présence d'un excès d'iodure de potassium, libère une quantité équivalente d'iode, qui est titrée à l'hyposulfite en présence d'empois d'amidon. Les calculs sont faits à partir d'une prise témoin de bichromate, titrée exactement dans les mêmes conditions.

e) Dosage de l'azote.

Pour l'azote total, nous avons utilisé la méthode de LUBOCHINSKY et ZALTA (56) sans aucune modification.

f) Appareillage.

Les mesures de pH ont été réalisées avec l'électrode de verre et l'appareil MECI type PV. La standardisation se faisait à partir d'une solution saturée à 20°C de tartrate acide de potassium, dont le pH est égal à 3,56.

Pour les mesures colorimétriques, on a utilisé le colorimètre Lumetron et les tubes calibrés 13 × 130 mm fournis par le constructeur. Les spectres ont été tracés avec le spectrophotomètre enregistreur Cary, modèle 14, utilisant des cuves en quartz de 1 cm d'épaisseur.

CHAPITRE III

ÉTUDE DE L'OXYDATION DE L'ÉTHANOL ET DE SON INHIBITION PAR LE SULFITE

La transformation de l'éthanol en acide acétique a déjà donné lieu à de nombreuses études réalisées soit avec des bactéries non proliférantes, soit avec des poudres acétoniques et plus récemment avec des extraits enzymatiques. Il est cependant utile de préciser, dans le cas de la souche que nous avons utilisée, les conditions optimum et les limites de cette réaction. Jusqu'ici la plupart des études avaient été faites dans des milieux dont le pH était voisin de 7. Comme notre but est d'étudier l'inhibition par l'acide sulfureux, qui est particulièrement nette en milieu acide, il est indispensable de rechercher le tampon qui peut le mieux convenir à cet usage. Nous avons aussi étudié la vitesse de réaction en fonction du pH et de la concentration en éthanol. Cette réaction étant bien définie, nous avons cherché à démontrer qu'elle est inhibée par l'acide sulfureux. Notre étude nous a conduit à montrer la réversibilité de l'inhibition, à étudier sa nature et à rechercher comment elle varie en fonction de la durée de l'incubation et du pH du milieu,

I. — Oxydation de l'éthanol.

a) Choix du tampon.

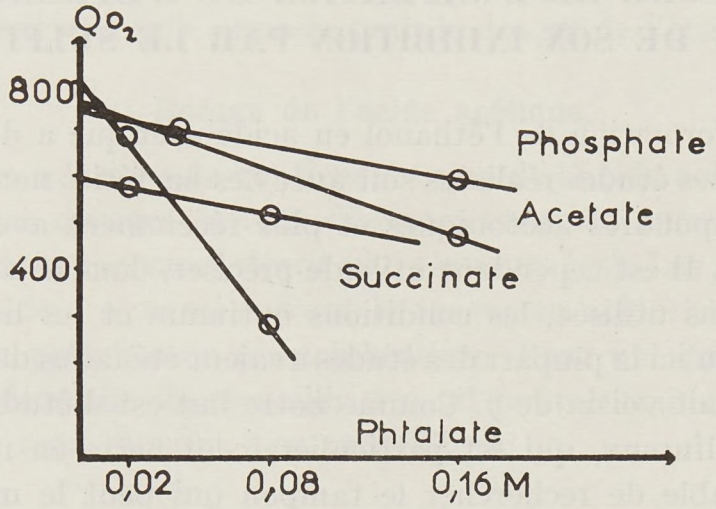
Nous avons cherché un tampon efficace dans la large zone de pH que nous désirions utiliser. On sait en effet, que l'action de l'acide sulfureux varie considérablement avec l'acidité du milieu, on sera donc amené à l'essayer dans des conditions très différentes. Le pH minimum utilisé dans notre travail est celui compatible avec une certaine activité oxydante des bactéries. C'est ainsi qu'un pH de 2,6 représente pour la souche employée des conditions biologiques acceptables, puisque la respiration est encore la moitié de ce qu'elle est à l'optimum. Le pH maximum correspond à celui pour lequel l'acide sulfureux ne possède presque plus d'action inhibitrice : il est voisin de la neutralité.

Voici les divers tampons habituellement utilisés susceptibles de répondre à cette condition (36) :

Tampon citrate	0,1 M	pH 3,0 à 6,2
Tampon acétate	0,2 M	pH 3,6 à 5,6
Tampon succinate	0,2 M	pH 3,8 à 6,0
Tampon phtalate	0,2 M	pH 2,2 à 6,0
Tampon citrate-phosphate (McIlvaine)		pH 2,6 à 7,0

Ces deux derniers tampons sont les plus avantageux. Il reste à vérifier s'ils ne sont pas toxiques pour les bactéries et si on peut les employer à une concentration suffisante.

Le graphique 4 montre l'influence de la concentration de ces divers tampons sur l'oxydation de l'éthanol. Les tampons ont été ajustés à



GRAPHIQUE 4. — Influence de la concentration de divers tampons sur l'oxydation de l'éthanol. Respiration mesurée par la technique de WARBURG. Atmosphère : air. Température 30°, pH 3,8 ± 0,02. Mélange réactionnel = Bactéries 0,25 mg/ml. Ethanol 0,04 M. Volume final 2,5 ml. Résultats exprimés en µ l. O_2/mg. h.

pH 3,8 avec une précision de ± 0,02 unités. On a aussi introduit dans cette série de tampons, une solution de phosphate monopotassique et acide phosphorique portée au même pH, bien qu'elle ne présente aucune capacité tampon.

TABLEAU V

Respiration d'A. rancens dans le tampon Mc Ilvaine.

	Substrat	pH	Concentration du tampon exprimée en fonction de $PO_4 \equiv$	QO_2
1	eau	5,8	0	4,3
2	eau	6,8	0,066 M	4,7
3	eau	3,8	0,028 M	0
4	éthanol 0,04 M	3,8	0,056 M	513
5	éthanol 0,04 M	3,8	0,014 M	560

Respiration mesurée par la technique de Warburg. Atmosphère : air. Température 30°. Mélange réactionnel. Bactéries 0,86 mg dans les fioles (1, 2, 3) et 0,58 mg dans les fioles 4 et 5. Volume final 2,5 ml. Résultats exprimés en µl. O_2/mg. h.

Il ressort de ces essais que les divers tampons employés produisent tous à pH 3,8 une certaine inhibition de l'oxydation de l'éthanol par *Acetobacter*. Le phtalate se montre fortement toxique et ne peut être retenu. Les autres le sont beaucoup moins, mais il est cependant préférable de les utiliser à faible concentration. On a choisi pour cette étude

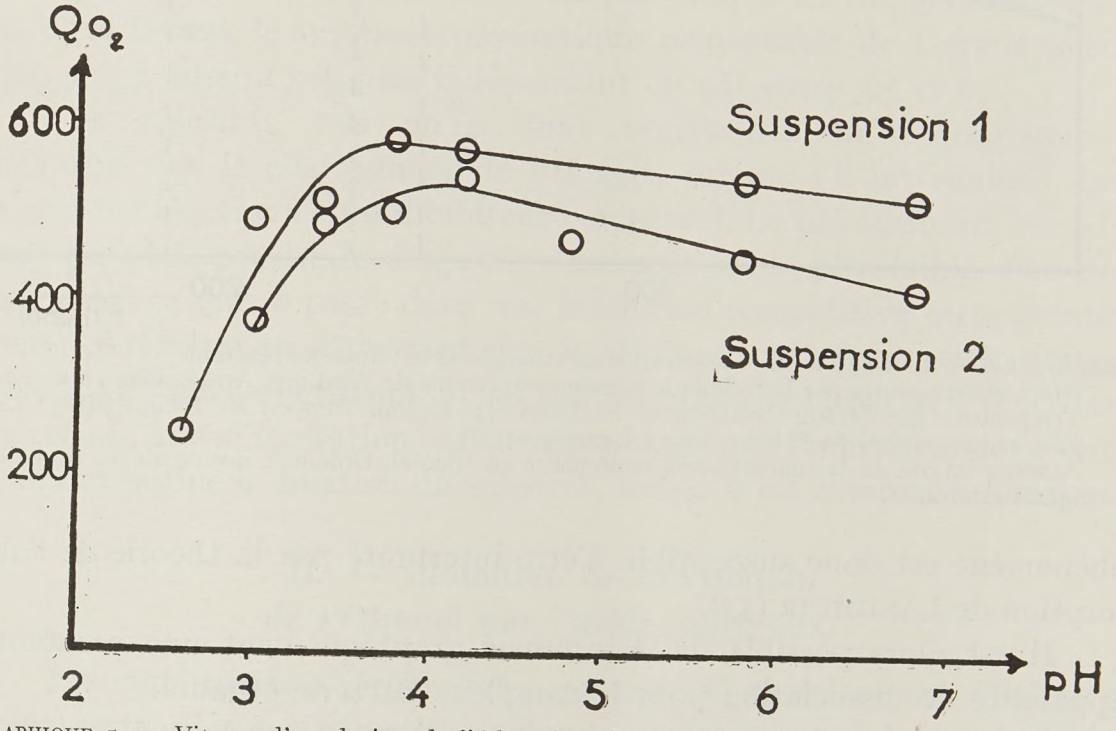
le tampon acide citrique phosphate de Mc Ilvaine, qui est parmi les moins toxiques ainsi que le démontrent les résultats rapportés dans le tableau V.

Il permet en outre de couvrir toute l'échelle des pH intéressants. On a vérifié que les bactéries sont incapables d'oxyder l'acide citrique dans les conditions où se font les mesures. La respiration endogène qui est faible à pH 6,8 n'est plus décelable à pH 3,8.

Le tampon Mc Ilvaine présente un inconvénient : la concentration ionique varie beaucoup avec le pH, puisqu'on le réalise avec une solution d'acide citrique 0,1 M et du phosphate disodique 0,2 M. C'est pourquoi dans les indications expérimentales que nous serons amenés à donner, nous indiquerons la concentration du phosphate dans chaque expérience.

b) **Action du pH et de la concentration en éthanol.**

Avec deux préparations différentes de bactéries non proliférantes, on a déterminé la vitesse d'oxydation de l'éthanol pour une zone de pH s'étendant de 2,6 à 6,8.

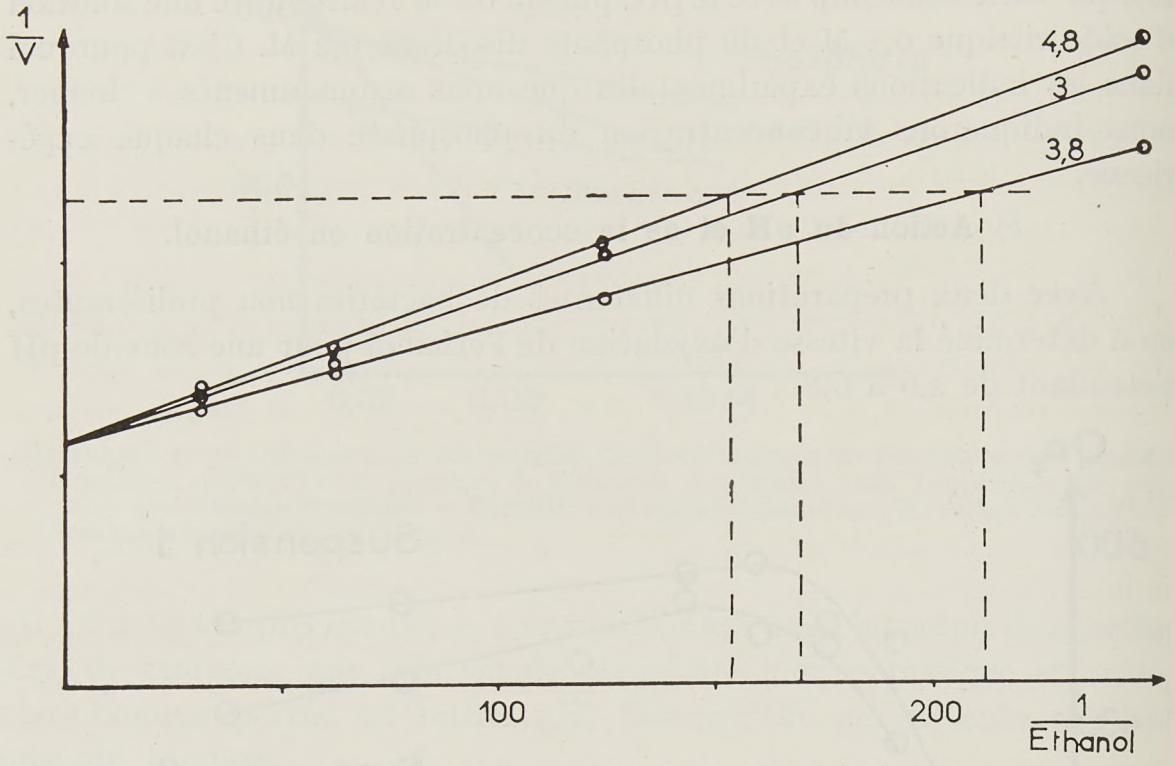


GRAPHIQUE 5. — Vitesse d'oxydation de l'éthanol en fonction du pH. Respiration mesurée par la technique de WARBURG. Atmosphère : air. Température 30°. Mélange réactionnel : Bactéries 0,33 mg/ml (suspension 1) et 0,30 mg/ml (suspension 2). Éthanol 0,04 M. Tampon Mc Ilvaine pH 2,6 à 6,8 avec concentration en $PO_4 \equiv$ de 0,0086 M à 0,065 M suivant le pH. Résultats exprimés en μ l. O_2/mg h.

Les résultats reproduits sur le graphique 5 montrent que dans les deux cas le pH optimum est compris entre 3,8 et 4,2. Il est intéressant de noter que cette réaction se montre peu sensible au pH neutre et qu'elle se poursuit encore avec une vitesse appréciable à pH 2,6. Les bactéries utilisées conviennent donc bien pour permettre d'étudier l'inhibition par le sulfite en milieu acide.

On a remarqué que la vitesse maximum de l'oxydation de l'éthanol varie avec sa concentration et on a cherché à voir dans quelle mesure le pH peut agir sur ce phénomène. Pour ce faire, les vitesses initiales de l'oxydation de l'éthanol, à diverses concentrations, et à divers pH, ont été déterminées.

Le graphique 6 indique qu'il existe une relation linéaire entre l'inverse de la concentration en éthanol et l'inverse de la vitesse de réaction, le



GRAPHIQUE 6. — Influence de la concentration en éthanol sur la vitesse de réaction.
Respiration mesurée par la technique micromanométrique de Warburg. Atmosphère : air. Température 30°. Mélange réactionnel. Bactéries 0,36 mg/ml. Tampon Mc Ilvaine pH 3 ; 3,8 ; 4,8 ; concentrations en $PO_4 \equiv$ 0,017 ; 0,029 ; 0,041 M.
Abscisse inverse de la concentration moléculaire en éthanol. Ordonnée inverse de la vitesse en unités arbitraires.

phénomène est donc susceptible d'être interprété par la théorie de l'absorption de LANGMUIR (53).

Il est alors possible de déterminer graphiquement une constante apparente de dissociation pour le complexe bactérie-éthanol.

On a obtenu les valeurs suivantes qui correspondent à trois pH différents :

pH	3	K apparent = 5,9 10^{-3}M
—	3,8 (optimun)	— = 4,7 —
—	4,8	— = 6,5 —

L'existence de cette constante rend compte de deux faits : d'abord de ce que le substrat donne avec la bactérie une combinaison dissociable dans laquelle n'intervient qu'une seule molécule de substrat et ensuite de ce que la vitesse de réaction est proprotionnelle à la concentration en éthanol.

On est en droit de penser que les points de réaction de l'éthanol sur

les bactéries sont facilement accessibles, soit qu'ils se trouvent localisés sur la membrane, soit que cette dernière possède une très grande perméabilité. En effet lorsqu'on détermine la constante apparente de dissociation de l'éthanol et de l'extrait enzymatique, on obtient des valeurs très voisines. C'est ainsi que pour deux déterminations sur l'extrait, on a obtenu à pH 3,8, 5,1 et 5,4 10^{-3} M alors qu'on obtenait 4,7 10^{-3} M avec des bactéries au même pH. Une constatation analogue a déjà été faite par HESTRIN (40) en ce qui concerne l'invertase des levures. Cet auteur a conclu de l'identité des constantes de dissociation que l'enzyme est proche de la surface cellulaire.

Lorsqu'on considère l'action du pH sur la réaction, on remarque qu'elle est différente de celle que l'on est habitué à trouver pour les systèmes enzymatiques. La courbe d'activité en fonction du pH n'est pas une courbe en cloche symétrique par rapport à l'optimum. Elle ne peut donc être expliquée par la dissociation de la protéine enzymatique qui donnerait naissance à des formes inactives de la molécule. Ce comportement particulier envers le pH n'est pas unique en son genre. Dans le cas de la levure, le système enzymatique responsable de l'oxydation du glucose est aussi à peu près indépendant du pH entre 3,5 et 8.

Les résultats tels qu'ils sont représentés sur le graphique 6 indiquent que le changement de pH agit, comme s'il introduisait dans le système réactionnel un inhibiteur compétitif. Le pH optimum est celui pour lequel la constante d'équilibre mesurée est la plus faible. Par analogie avec ce qui se passe dans une inhibition compétitive, on peut interpréter ce résultat en admettant que le pH intervient pour rendre impossible la fixation de l'éthanol sur les centres actifs de la bactérie possédant un certain état d'ionisation, de la même façon que l'inhibiteur compétitif rend impossible la fixation du substrat, lorsqu'il est combiné à l'enzyme.

II. — Inhibition de l'oxydation de l'éthanol par l'acide sulfureux.

Les conditions expérimentales qui ont été choisies pour étudier ce point particulier ont nécessité quelques expériences préalables destinées à montrer leur validité. Les mesures se faisant dans l'appareil de Warburg en aérobiose, il est indispensable de vérifier ce que devient le sulfite, de rechercher dans quelle mesure il s'oxyde et si cette réaction n'introduit pas d'erreur importante dans la mesure de l'absorption d'oxygène.

a) Oxydation du sulfite au cours des expériences.

Le sulfite peut se transformer en sulfate par oxydation, ou bien se fixer sur la potasse contenue dans la tubulure centrale des fioles de Warburg, comme le fait l'acide cyanhydrique. La première réaction diminue

de vitesse à mesure que le milieu devient plus acide, alors que l'augmentation d'acidité augmente la tension de vapeur de l'anhydride sulfureux dans ses solutions et facilite sa fixation sur la potasse.

TABLEAU VI

Disparition de l'acide sulfureux pendant les expériences faites dans l'appareil de Warburg.

	SO_2 en µ mol./ml.			
1° Tampon phosphate pH 6 : 0,05 M	—			
SO_2 au début de l'expérience	1,87			
après 70 minutes d'agitation :				
fiole sans KOH	0,83			
fiole avec KOH	0,46			
2° Tampon Mc Ilvaine pH 3,8. Concentration en $PO_4 \equiv$ 0,035 M				
SO_2 au début de l'expérience (1)	3,70	3,75	1,56	1,54
après 35 minutes d'agitation :				
fiole sans KOH	2,01	2,52	0,84	1,05
fiole avec KOH	2,05	2,23	0,86	0,93

(1) Expérience répétée 4 fois. Atmosphère : air. Température 30°. Volume total 2,4 ml. SO_2 déterminé par la méthode de Grant.

Le tableau VI donne les résultats de deux séries d'expériences faites à pH 6 et pH 3,8. Des solutions de sulfite à des concentrations légèrement supérieures à celles que nous avons utilisées par la suite, ont été agitées dans des fioles de Warburg contenant ou ne contenant pas de la potasse,

TABLEAU VII

Comparaison de la respiration et de la respiration endogène en présence et en l'absence de l'acide sulfureux.

	QO_2	
	Sans substrat	Éthanol 0,05 M
SO_2 seul	4	—
Bactéries	18	596
Bactéries + SO_2	17	17
Bactéries bouillies + SO_2	17	15

Bactéries 0,65 mg/ml mises en incubation 30 minutes à 30° dans du tampon Mc Ilvaine pH 3,8, concentration en $PO_4 \equiv$ 0,032 M. Sulfite 1,5 µ mol./ml. Respiration mesurée selon la technique de Warburg. Atmosphère : air. Température 30°. Volume final 2,1 ml. Résultats exprimés en µ l. O_2/mg. h.

et le sulfite a été dosé colorimétriquement au début et à la fin de l'expérience. On voit que la diminution de la concentration en sulfite est loin d'être négligeable même à pH 3,8. En revanche, à ce pH, le phénomène de migration sur la potasse est peu marqué. On constate des disparitions variables d'une fiole à l'autre. L'oxydation du sulfite, qui est d'après nos expériences la cause prépondérante de sa disparition, ne peut cependant pas donner d'erreur importante dans la mesure de l'oxygène absorbé. Elle se produit surtout pendant les 10 minutes où se réalise l'équilibre

des températures, et qui précèdent toujours le début des mesures. Par la suite, elle devient très faible comme le montrent les résultats du tableau VII et complètement négligeable devant la respiration des bactéries.

b) **Avantage d'une incubation en présence d'acide sulfureux.**

Il n'est pas possible d'obtenir des résultats reproductibles lorsqu'on introduit l'inhibiteur dans la fiole de Warburg avant de faire les mesures. Ceci ne nous surprend pas, puisqu'on a remarqué que le sulfite disparaissait avec des vitesses différentes d'une fiole à l'autre. Pour éviter cet inconvénient, il est donc indispensable de faire une incubation préalable des bactéries en présence de sulfite. Nous l'avons réalisée à la température de 30°, dans des tubes à essais pleins, obturés par un bouchon de caoutchouc. Dans ces conditions, l'oxydation est faible ainsi qu'on peut s'en rendre compte dans le tableau VIII.

TABLEAU VIII

Disparition de l'acide sulfureux au cours de l'incubation.

	Temps d'incubation en heures	Témoin	Avec bactéries	Avec bactéries + éthanol
SO_2 libre dans le liquide.....	0	0,780	0,692	0,519
	2,5	0,788	0,615	0,353
	3,5	0,730	0,570	0,303
	5,5	0,704	0,475	0,209
SO_2 combiné dans le liquide..	0	0	0,006	0,141
	2,5	0	0,023	0,310
	3,5	0	0,057	0,312
	5,5	0,015	0,043	0,298

25 ml du mélange mis en incubation à 30° dans des tubes à essais. Dosage iodométrique de SO_2 libre et combiné dans le liquide après centrifugation. SO_2 exprimé en μ mol/ml, tampon Mc Ilvaine, pH 3,8 $PO_4 \equiv$ 0,028 M, bactéries 0,43 mg/ml, éthanol 0,04 M.

Lorsque les bactéries sont mises en incubation en l'absence d'éthanol, le sulfite libre diminue, sans qu'on le retrouve combiné. Deux explications sont possibles, ou bien les bactéries catalysent son oxydation, ou bien il se combine avec les corps bactériens et échappe aux dosages à cause de la centrifugation préalable qui l'élimine en même temps que les bactéries. L'impossibilité de doser le sulfate, même avec une méthode sensible comme celle de DOGSON et SPENCER (22), dans une solution aussi diluée et contenant des phosphates, ne nous a pas permis de mettre en évidence l'une ou l'autre des raisons de la disparition du sulfite. Cette question sera résolue par l'emploi du sulfite radioactif comme on le verra dans la suite.

Lorsqu'on met en incubation les bactéries avec du sulfite en présence

d'éthanol, on constate l'apparition de quantités importantes de sulfite combiné. Ces résultats apparaissent dans le tableau VIII. Comme un dosage a mis aussi en évidence la présence d'éthanal à la dose de 0,5 µ mol/ml, on doit admettre que le sulfite est lié à l'éthanal dans une combinaison bisulfitique. On a donc retrouvé à un pH de 3,8 une capture de l'éthanal par le sulfite analogue à celle que NEUBERG (63) avait mise en évidence en milieu neutre.

c) Conditions de l'incubation.

Les conditions dans lesquelles se fait l'incubation en présence de sulfite, doivent être normalisées pour obtenir des résultats reproductibles. Le temps de contact est extrêmement important, comme le montre le tableau IX.

TABLEAU IX

Influence de la durée d'incubation.

Durée de l'incubation	Inhibition % Bactéries 0,22 mg/ml	Bactéries 1,1 mg/ml
15 minutes	100	26
180 minutes	100	100

Bactéries mises en incubation à 30° dans du tampon Mc Ilvaine pH 3,8 concentration en PO_4 ≡ 0,028 M. Sulfite 0,59 µ mol/ml. Respiration mesurée selon la technique de Warburg. Atmosphère : air. Température 30°. Éthanol 0,04 M. Volume final 2 ml et 0,4 ml pour la plus forte concentration en bactéries. Résultats exprimés en pourcentage d'inhibition.

Des temps trop longs produisent non pas une inhibition mais une action bactéricide ainsi que nous avons pu nous en rendre compte dans

TABLEAU X

Influence de l'éthanol pendant l'incubation.

	QO_2	Inhibition
Bactéries sans SO_2	493	
Bactéries avec SO_2		
éthanol ajouté avant incubation	491	0
— — après —	311	37 %

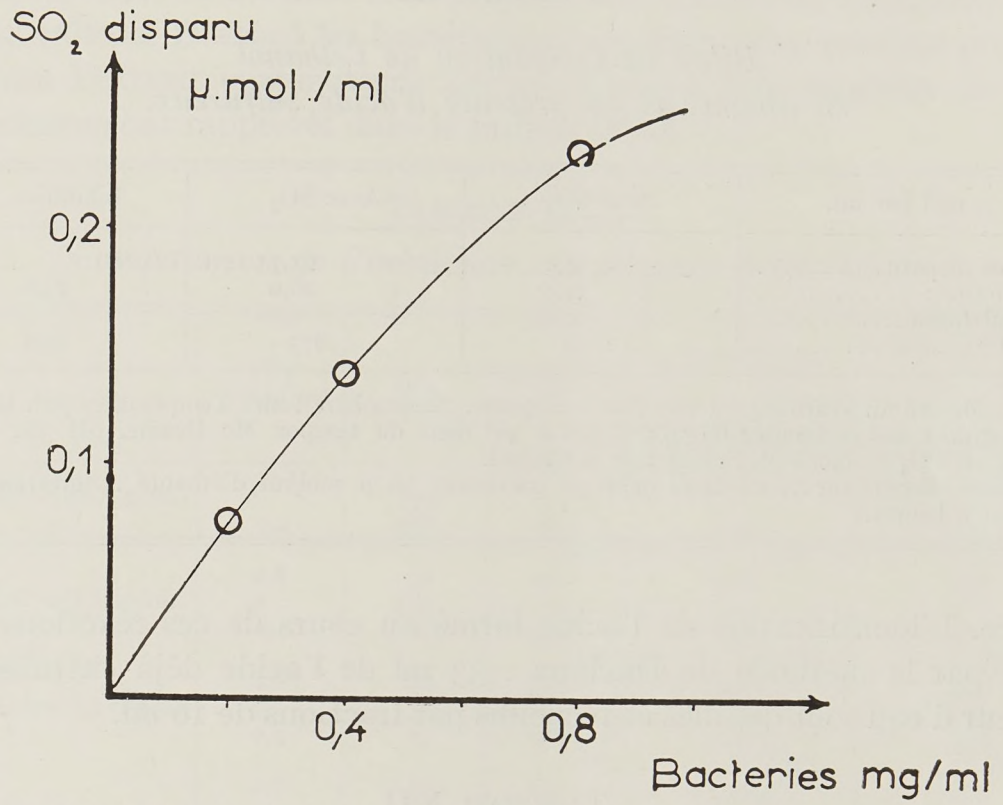
Bactéries 0,62 mg/ml mises en incubation 20 minutes à 30° dans du tampon Mc Ilvaine. pH 3,8 concentration en PO_4 ≡ 0,028 M. Sulfite 0,3 µ mol/ml. Éthanol 0,04 M. Respiration mesurée selon la technique de Warburg. Atmosphère : air. Température 30°. Résultats exprimés en µl O_2/mg. h.

d'autres expériences (24). Afin de rester dans la zone des phénomènes réversibles, nous avons limité, par la suite, la durée d'incubation de 15 à 30 minutes.

L'expérience décrite dans le tableau X montre que la concentration en sulfite rapportée à la masse bactérienne n'est pas indifférente au résultat de l'inhibition. Pour une même dose de sulfite, l'inhibition diminue lorsque la concentration en bactéries augmente.

Les résultats représentés par le graphique 7 permettent de constater que la quantité de sulfite disparu est d'autant plus forte qu'il y a davantage de bactéries.

L'expérience rapportée sur le tableau X montre aussi que l'éthanol exerce pendant l'incubation avec le sulfite une action protectrice qui



GRAPHIQUE 7. — Influence de la concentration en bactéries sur la disparition du sulfite pendant l'incubation.
Incubation de 250 minutes à 30° dans le tampon Mc Ilvaine, pH 3,8, concentration en PO_4 ≡ 0,028 M. Sulfite 0,67 µ mol/ml. Sulfite déterminé par iodométrie après centrifugation.

est complète dans ce cas. Il y a donc intérêt à éviter la présence du substrat au cours de l'incubation.

d) Bilan de l'oxydation de l'éthanol en l'absence et en présence d'acide sulfureux.

Il est difficile d'effectuer les analyses sur les faibles quantités mises en jeu dans les manomètres de Warburg. Aussi avons-nous fait les expériences dans des ballons de 600 ml contenant 45 ml de liquide, bouchés et agités. L'oxygène contenu dans le ballon soit (600-45) × 0,208 = 115 ml suffit à transformer plus de 5 000 µ molécules d'éthanol, il représente donc un gros excès par rapport aux 1 620 µ molécules qui ont été utilisées dans l'expérience rapportée au tableau XI.

Le bilan a été fait sur des bactéries non traitées et sur des bactéries inhibées par le sulfite. Dans les deux cas on voit que les molécules d'éthanol disparu correspondent aux molécules d'acide apparu. Avec les bac-

téries inhibées par le sulfite, on décèle la formation de quantités très faibles d'éthanal. Le pourcentage d'inhibition a été calculé à partir des dosages chimiques et de la détermination du Q O_2 faite par la méthode de Warburg. On constate que les deux résultats sont en bonne concor-

TABLEAU XI

Bilan de l'oxydation de l'éthanol en absence et en présence d'acide sulfureux.

µ mol par ml.	Sans SO_2	Avec SO_2	Inhibition %
Éthanol disparu	— 34,0	— 25,75	
Acide formé	+ 34,5	+ 26,0	24,6
Éthanal formé	+ 0,03	+ 0,10	
Q O_2 (1)	1220	873	28,5

(1) Mesuré au Warburg sur une partie aliquote. Atmosphère : air. Température 30°. Bactéries 0,64 mg/ml mises en incubation 30 minutes à 30° dans du tampon Mc Ilvaine. pH 3,8, concentration en $PO_4 \equiv$ 0,028 M. Sulfite 0,17 µ mol/ml.
Bilan effectué sur 45 ml de ce mélange contenant 36 µ mol/ml d'éthanol . Agitation à 35° pendant 4 heures.

dance. L'identification de l'acide formé au cours de ces réactions a été faite par la méthode de Duclaux : 33 ml de l'acide déjà entraîné à la vapeur d'eau sont distillés et recueillis par fractions de 10 ml.

TABLEAU XII

Identification de l'acide produit

Volume distillé	Pourcentage d'acidité recueillie		
	Échantillon sans SO_2	Échantillon avec SO_2	Théorique pour l'acide acétique
10	26,8	26,3	26
20	57,4	56,9	56,6
30	100	100	100

Les résultats du tableau XII indiquent le pourcentage d'acide distillé dans chaque fraction pour les deux échantillons et on constate qu'il correspond à ce que donnent les tables pour l'acide acétique.

Ces expériences démontrent que dans les conditions que nous avons choisies, la seule réaction produite par les bactéries est l'oxydation de l'éthanol en acide acétique. L'acide acétique n'est pas métabolisé et l'éthanal n'est présent qu'à l'état de traces. La réaction est exactement la même lorsqu'elle se fait en présence de sulfite, seule son intensité diminue.

e) Inhibition par l'acide sulfureux.

Les conditions expérimentales ayant été définies, nous nous sommes attaché à démontrer que l'acide sulfureux est bien un inhibiteur de l'oxydation de l'éthanol par *A. rancens*.

Pour cela, on a utilisé trois préparations différentes provenant de la même culture. D'abord les bactéries non proliférantes, puis les granules et enfin l'extrait enzymatique qui en dérivent. Les résultats de cette expérience sont rapportés dans le tableau XIII.

TABLEAU XIII

Comparaison de l'inhibition sur diverses préparations.

	SO_2 µ mol/ml	QO_2	Inhibition %	µ mol. SO_2/ml. mg matière sèche	Activité inhibée µl O_2/h µ mol SO_2/ml
Bactéries 0,26 mg/ml.	0	759	—	—	—
	0,4	558	26,5	1,54	131
			50	*2,05*	*185*
	0,8	31	96	3,08	236
Granules 1,54 mg/ml.	0	187	—	—	—
	0,4	90	52	0,26	373
			50	*0,24*	*390*
	0,8	28	85	0,52	307
Extrait clair 6,1 mg/ml	0	52	—	—	—
	0,4	27	48	0,065	381
			50	*0,07*	*372*
	0,8	17	67	0,013	267

Préparations mises en incubation 30 minutes à 0° dans du tampon Mc Ilvaine. pH 3,8 concentration en $PO_4 \equiv$ 0,028 M.
Respiration mesurée selon la technique de Warburg. Atmosphère : air. Température 30°. Ethanol 0,05 M. Résultats exprimés en µl. O_2/mg h.
Les valeurs *en italiques* sont obtenues par interpolation.

On a choisi à l'avance deux concentrations différentes en sulfite : 0,4 et 0,8 µ mol/ml et pour obtenir des inhibitions voisines, on a augmenté, lorsqu'on passait des bactéries aux granules et à l'extrait, la masse du produit utilisé. Pour comparer plus facilement les résultats, on a calculé par interpolation entre les résultats expérimentaux, la dose de sulfite qui produirait sur les trois préparations une inhibition de 50 p. 100. Ce mode de calcul implique que dans les limites où on l'applique, l'inhibition est proportionnelle à la concentration en inhibiteur. Les expériences représentées sur le graphique 8, montrent que ce mode de calcul est valable lorsque l'inhibition est voisine de 50 p. 100. L'approximation est sûrement très bonne dans le cas des granules et de l'extrait, où l'on a des valeurs de l'inhibition très proches de 50 p. 100. Dans le cas des bactéries, l'erreur est vraisemblablement plus forte, mais la valeur obtenue garde une signification intéressante. On a calculé dans l'avant der-

nière colonne du tableau XIII, pour chaque expérience, le rapport des µ molécules d'acide sulfureux au poids en mg de substance biologique (bactéries, granules, extrait) utilisée. Lorsqu'on considère l'inhibition à 50 p. 100, la quantité de SO_2 nécessaire pour l'obtenir varie de 2,05 µ mol/mg pour les bactéries, à 0,07 pour l'extrait. La dernière colonne de ce tableau, représente le rapport de l'activité inhibée à la concentration en acide sulfureux nécessaire pour la réaliser. Dans le cas de l'expérience sur les bactéries où l'on a obtenu une inhibition de 26,5 p. 100, le calcul est le suivant, si on rapporte tout au ml.

$$\frac{759 - 558 \times 0{,}26}{0{,}4} = 131 \frac{\mu \text{ l. } O_2/\text{heure}}{\mu \text{ mol. } SO_2}$$

On constate alors que pour une inhibition de 50 p. 100, cette valeur est à peu près constante lorsqu'on passe des granules à l'extrait. Pour les bactéries, l'ordre de grandeur est respecté. Ce calcul montre donc qu'il semble exister, quelle que soit la préparation, une relation entre la concentration en acide sulfureux que l'on réalise et la valeur absolue de l'activité inhibée.

Nous avons voulu confirmer ce résultat par une autre expérience destinée à démontrer que l'addition de bactéries dépourvues d'activité enzymatique ne modifie pas d'une façon sensible l'inhibition.

TABLEAU XIV

Influence des bactéries inactives sur l'inhibition.

	Q O_2 (1)	Inhibition
	—	—
Bactéries :		
sans SO_2	600	
avec SO_2	420	30 %
Bactéries + bactéries inactivées :		
sans SO_2	619	
avec SO_2	390	37 %

Bactéries 0,37 mg/ml mises en incubation 20 minutes à 30° dans du tampon Mc Ilvaine. pH 3,8 concentration en $PO_4 \equiv$ 0,028 M. Sulfite 0,31 µ mol/ml. Bactéries inactivées par ébullition 0,37 mg/ml. Respiration mesurée selon la technique de Warburg. Atmosphère : air. Température 30°. Ethanol 0,05 M. Résultats exprimés en µ l. O_2/mg h.

(1) QO_2 calculé sans tenir compte des bactéries inactives.

Le tableau XIV contient les résultats d'une expérience où l'on a réalisé une inhibition de 30 p. 100. L'expérience répétée avec une suspension contenant en plus une quantité égale de bactéries inactivées par l'ébullition ne modifie pas significativement le taux d'inhibition que l'on retrouve égal à 37 p. 100.

Ces deux expériences démontrent que le sulfite réagit bien sur le système responsable de l'oxydation de l'éthanol, puisque la concentration nécessaire pour obtenir une inhibition donnée est proportionnelle à l'activité que l'on veut inhiber.

Inhibition de l'oxydation de divers substrats

Outre l'éthanol, les bactéries acétiques peuvent aussi oxyder d'autres substrats. L'espèce que nous avons utilisée, *A. rancens*, peut notamment attaquer l'éthanal, l'acide lactique et le glucose. On a donc recherché si l'inhibition par le sulfite se retrouvait pour l'oxydation de ces substrats. Le tableau XV donne les résultats d'une expérience dans laquelle on a mesuré, en présence de divers substrats, le taux d'inhibition de la respiration de bactéries ayant subi une incubation en présence d'acide sulfureux. Il apparaît que le taux d'inhibition obtenu est différent suivant que l'on considère l'un ou l'autre substrat. Lorsqu'on calcule le rapport entre l'activité inhibée et la concentration en sulfite, de la même façon que dans la dernière colonne du tableau XIII, on trouve qu'il est à peu près constant pour trois substrats. Seul le glucose fait exception, mais dans ce cas le calcul n'est plus valable, car on aurait peut-être pu obtenir une inhibition complète avec une dose d'inhibiteur bien plus petite. Ceci vient renforcer les conclusions tirées des expériences précédentes et établit que l'acide sulfureux réagit spécifiquement avec les systèmes enzymatiques.

Tableau XV

Inhibition de l'oxydation de divers substrats.

Substrat	QO_2			
	Sans SO_2	Avec SO_2	Inhibition %	QO_2 inhibé
Ethanol.....	660	294	55 %	366
Ethanal.....	870	514	41 %	356
Lactate de Na....	376	40	89 %	336
Glucose	78	0	100 %	78

Bactéries 0,20 mg/ml. mises en incubation 20 minutes à 30° dans un tampon Mc Ilvaine. pH 3,8 concentration en $PO_4 \equiv$ 0,028 M. Sulfite 0,4 μ mol/ml. Respiration mesurée selon la technique de Warburg. Atmosphère : air. Température 30°. Substrat 0,05 M. Résultats exprimés en μ l O_2/mg.h.

Influence du pH

L'inhibition de l'oxydation de l'éthanol par l'acide sulfureux a été étudiée en fonction du pH. Les mesures ont été faites dans une échelle de pH s'étendant de 3 à 4,2. Il n'a pas été possible de les continuer dans des milieux moins acides, car intervient alors d'une façon prépondérante un mode d'inhibition différent : à savoir la capture de l'éthanal par le bisulfite. Dans ces conditions, en augmentant la dose de sulfite on ne peut obtenir qu'une inhibition de 50 p. 100 pour la raison que nous exposerons dans la discussion.

Le tableau XVI présente les résultats d'une série d'essais où l'inhibi-

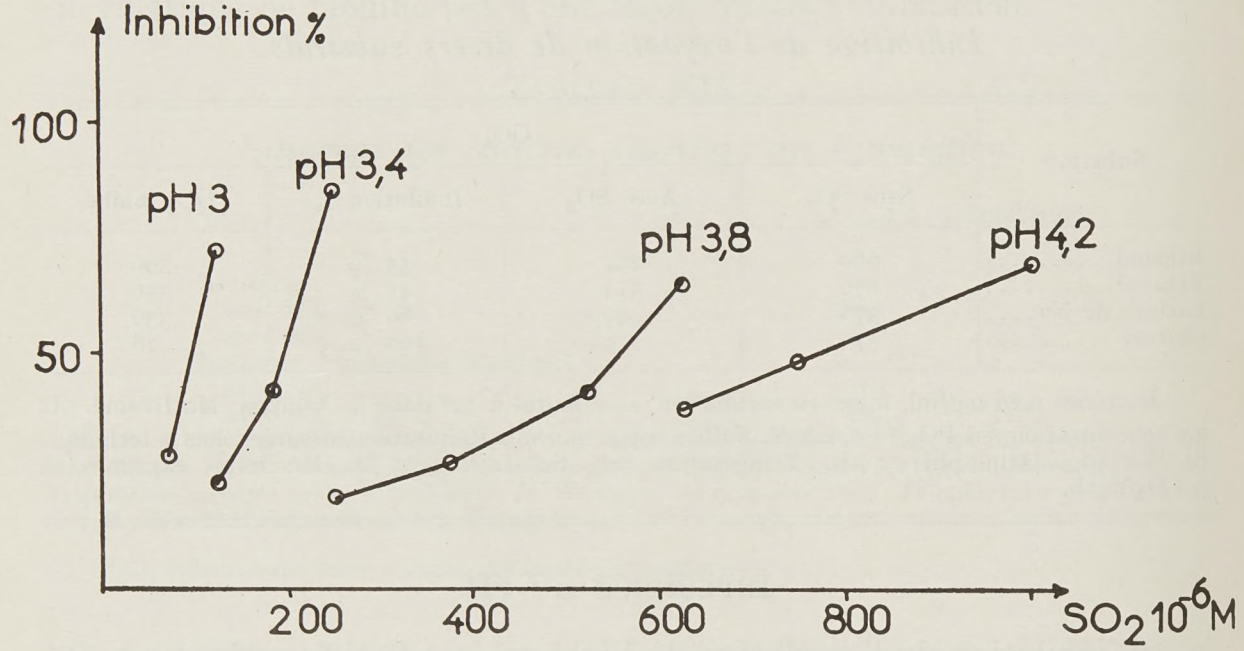
tion a été réalisée à divers pH avec des doses croissantes de sulfites. Les essais sont comparables entre eux, puisque les bactéries proviennent de la même récolte et que la quantité utilisée est la même dans chaque expérience. Ce dernier point est important puisqu'une expérience précédente nous a démontré que l'inhibition dépend, non seulement de la concen-

TABLEAU XVI

Variations de la respiration (Q O_2) sous l'influence combinée du pH et de l'acide sulfureux.

pH ↓ QO_2 ↘	SO_2 en µ mol/l.									
	0	75	125	187,5	250	375	525	625	750	1000
3	237	167	60							
3,4	302		232	173	60					
3,8	426				344	310	247	147		
4,2	362							223	189	113

Bactéries 0,52 mg/ml mises en incubation 30 minutes à 30° dans du tampon Mc Ilvaine. pH 3 à 4,2, concentration en $PO_4 \equiv$ 0,02 M à 0,041 M. Respiration mesurée selon la technique de Warburg. Atmosphère : air. Température 30°. Ethanol 0,05 M. Résultats exprimés en µ l O_2/mg. h.



GRAPHIQUE 8. — Influence du pH sur l'inhibition par le sulfite. Graphique obtenu à partir des résultats du tableau XVI.

tration en sulfite, mais encore de la quantité de bactéries employées. A chaque essai correspond un chiffre, qui indique le Q O_2 déterminé grâce à la méthode de Warburg à partir des observations faites dans les 20 premières minutes.

Le graphique 8 obtenu à partir des mêmes expériences indique pour quatre pH différents, que le pourcentage d'inhibition est proportionnel

à la concentration en sulfite, tant qu'on considère des inhibitions voisines de 50 p. 100. Afin de comparer entre eux les résultats obtenus à des pH différents, on a déterminé graphiquement la dose de sulfite nécessaire pour réaliser une inhibition de 50 p. 100. C'est l'objet du tableau XVII.

TABLEAU XVII

Calcul de la dose d'acide sulfureux pour réaliser une inhibition de 50 p. 100 à divers pH.

pH	SO_2 en µ mol/l. donnant 50% d'inhibition	Forme SO_3H_2 en µ mol/l.	Forme SO_3H^- en µ mol./l
3	95	5,2	89,2
3,4	195	4,4	190,5
3,8	555	5,06	549
4,2	780	2,76	774

Valeurs calculées à partir du tableau XVI.

On a aussi calculé dans chaque cas les concentrations en molécules SO_3H_2 et en ions SO_3H^- auxquelles correspondent les doses de sulfite employées. On a utilisé pour ce calcul les formules approximatives

$$\log \frac{(SO_3H^-)}{(SO_3H_2)} = pH - pK_1$$

$$\log \frac{(SO_3^=)}{(SO_3H^-)} = pH - pK_2$$

en prenant $pK_1 = 1{,}765$ et $pK_2 = 7{,}205$ d'après les données de TARTAR et GARRETSON (82). On voit alors que, sauf pour l'expérience faite à pH 4,2 il semble que l'inhibition de 50 p. 100 soit obtenue lorsque le milieu contient 4,4 à 5,2 µ molécules par litre d'acide sulfureux sous sa forme moléculaire SO_3H_2. Comme ceci n'est vrai que dans un intervalle de pH assez étroit, il ne nous paraît pas possible d'affirmer que seules les molécules d'acide sulfureux ont des propriétés inhibitrices vis-à-vis d'*Acetobacter*. Les ions SO_3H^-, dont la toxicité ne paraît pas jouer de rôle entre 3 et 3,8, doivent contribuer à l'inhibition, lorsqu'on se trouve à un pH plus élevé.

RÉVERSIBILITÉ DE L'INHIBITION

On distingue habituellement deux sortes d'inhibitions : celles qui sont absolues et celles qui sont réversibles. Les inhibitions absolues peuvent être dues à la formation d'une combinaison irréversible ou à une altération des protéines enzymatiques. Or on sait que le sulfite est capable de détruire des liaisons disulfures, et il peut donc endommager les protéines. Mais nous allons montrer que dans des conditions où l'acide sulfureux est incapable d'endommager les liaisons disulfures, par suite du pH trop bas

et de sa trop faible concentration, il se montre un inhibiteur réversible de la réaction enzymatique étudiée.

Plusieurs moyens ont permis de produire cette réversibilité. Le premier consiste à laver les bactéries déjà inhibées.

TABLEAU XVIII

Réversibilité de l'inhibition, par lavage.

	SO_2 µ mol/ml.	QO_2	Inhibition
Bactéries avant lavage.....	0	536	
	0,5	448	16 %
	1	0	100 %
	2	0	100 %
Bactéries après lavage	0	468	
	0,5	416	11 %
	1	416	11 %
	2	400	15 %

Bactéries 0,5 mg/ml mises en incubation 30 minutes à 0° dans du tampon Mcllvaine. pH 3,8 Concentration en PO_4 ≡ 0,032 M. Pour le lavage : 5 ml du mélange centrifugé 6 minutes à 3000 g. culot repris dans le même volume du même tampon. Respiration mesurée selon la technique de Warburg. Atmosphère : air Température 30°. Ethanol 0,05 M. Résultats exprimés en µ l. O_2/mg. h.

Le tableau XVIII donne les résultats d'une expérience où des bactéries mises en présence de doses croissantes de sulfite ont présenté des inhibitions complètes. Il suffit de les centrifuger et de les remettre en suspension dans le même tampon pour retrouver une activité qui représente 85 à 89 p. 100 de celle du témoin.

TABLEAU XIX

Réversibilité de l'inhibition, par dilution.

	SO_2 pendant la mesure en µ mol/ml.	QO_2	Inhibition
Bactéries ⊕		644	
Bactéries + SO_2 ⊕	2,3	c	100 %
Bactéries diluées (×)		676	
Bactéries + SO_2 diluées (×)	0,76	273	60 %

Bactéries 10,3 mg/ml. mises en incubation 30 minutes à 0° dans du tampon Mc Ilvaine pH 3,8. Concentration en PO_4 ≡ 0,032 M. Sulfite 16 µ mol/ml. Respiration mesurée selon la technique de Warburg. Atmosphère : air. Température 30°. Ethanol 0,05 M. Bactéries diluées 7 fois (⊕) et 21 fois (×). Résultats exprimés en µ l.O_2/mg.h.

La dilution des bactéries inhibées, diminue aussi l'inhibition. C'est ce que prouve l'expérience décrite par le tableau XIX.

Ces bactéries ont reçu une très forte dose de sulfite et on a mesuré leur respiration après les avoir diluées 7 et 21 fois. A la dilution la moins

forte, l'inhibition est encore complète alors qu'elle n'est plus que de 60 p. 100 dans l'autre cas.

On a déjà vu que l'inhibition par le sulfite varie beaucoup suivant le pH du milieu où elle se réalise. Les résultats relatés dans le tableau XX se rapportent à une inhibition qui a été réalisée à pH 3,8. Lorsqu'on mesure la respiration à des pH plus élevés l'inhibition qui était presque complète diminue jusqu'à un taux de 20 p. 100.

TABLEAU XX

Réversibilité de l'inhibition, par changement du pH.

pH de la mesure	3	3,8	4,8	5,8	6,8
QO_2 Incubé sans SO_2	309	404	312	261	251
QO_2 Incubé avec SO_2	0	34	238	208	182
Inhibition %	100	91	39	20	27

Bactéries 10 mg/ml mises en incubation 30 minutes à 30° dans du tampon Mc Ilvaine. pH 3,8 concentration en $PO_4\equiv$ 0,032 M. Sulfite 13 µ mol/ml. Respiration mesurée selon la technique de Warburg. Atmosphère : air. Température 30°. Ethanol 0,05 M. Bactéries diluées 20 fois avec du tampon Mc Ilvaine au pH indiqué. Résultats exprimés en µ l. O_2/mg.h.

Un autre moyen de supprimer l'inhibition consiste à mesurer la respiration des bactéries inhibées, en présence d'éthanal. Les résultats d'une telle expérience se trouvent dans le tableau XXI.

TABLEAU XXI

Réversibilité de l'inhibition par addition d'éthanal.

Concentration en éthanal µ mol/ml.	177	35,4	7,1
QO_2 Incubé sans SO_2	443	420	361
QO_2 Incubé avec SO_2	392	221	161
Inhibition en %	12	47	56

Bactéries 0,21 mg/ml mises en incubation 20 minutes à 30° dans du tampon Mc Ilvaine pH 3,8 concentration en $PO_4\equiv$ 0,032 M. Sulfite 0,4 µ mol/ml. Respiration mesurée selon la technique de Warburg. Atmosphère : air. Température 30°. L'éthanal ajouté entraine une dilution de 2 ml à 2,4 ml. Résultats exprimés en µ l. O_2/mg. h.

On constate que l'inhibition passe de 56 à 12 p. 100 lorsque la concentration en éthanal s'élève de 7 à 177 µ mol/ml. Ce résultat s'explique par la grande affinité de l'éthanal pour le sulfite qui donne une combinaison éthane hydroxy sulfonate dépourvue de toxicité. ZELITCH (93) a signalé que ce corps est un inhibiteur de l'oxydase de l'acide glycolique. Aussi avons-nous pensé qu'il était bon de vérifier qu'il n'inhibe pas la respiration de notre bactérie.

L'expérience, dont les résultats sont rapportés dans le tableau XXII, consiste à mesurer l'oxydation de l'éthanol en présence de quantités croissantes d'éthane-hydroxy-sulfonate de sodium préparé suivant la technique de BUNTE (11). La faible inhibition produite par la plus forte

dose s'explique par la dissociation de ce composé qui libère une petite quantité de sulfite. On peut donc conclure que l'affinité du sulfite pour les fonctions chimiques avec lesquelles il se combine dans les bactéries est moins grande que son affinité pour l'éthanal, puisque ce dernier restaure l'activité des bactéries inhibées. Les mesures que nous avons faites donnent comme constante de dissociation du sulfite en tant qu'inhibiteur des valeurs de 7 à 8 10^{-4} M, alors que la combinaison chimique éthanal sulfite possède d'après KERP (49) une constante de dissociation égale à 2,4 10^{-6} M, ce qui indique que le complexe formé avec les bactéries est moins stable que celui formé avec l'éthanal.

TABLEAU XXII

Influence de la combinaison bisulfique de l'éthanal sur l'oxydation de l'éthanol.

Aldéhyde sulfite µ mol/ml.	QO_2	Inhibition %
0	465	—
0,74	495	0
1,59	466	0
2,97	474	0
5,95	415	12

Bactéries 0.31 mg/ml. mises en iucubation 20 minutes à 30° dans du tampon Mc Ilvaine. pH 3,8. Concentration en $PO_4{=}$ 0,032 M. Respiration mesurée selon la technique de Warburg. Atmosphère : air. Température 30°. Ethanol 0,05 M. Résultats exprimés en µ l. O_2/mg. h.

TABLEAU XXIII

Influence de la tension d'oxygène sur l'inhibition.

SO_2 µ mol/ml.	Respiration dans l'air		Respiration dans l'oxygène	
	QO_2	Inhibition %	QO_2	Inhibition %
0	640		710	
0,2	504	21 %	564	20 %
0,4	408	36 %	472	33 %
0,6	220	65 %	210	70 %

Bactéries 0,5 mg/ml. mises en incubation 20 minutes à 30° dans du tampon Mc Ilvaine. pH 3,8. Concentration en $PO_4{=}$ 0,032 M. Respiration mesurée selon la technique de Warburg. Atmosphère : air ou oxygène. Température 30°. Ethanol 0,05 M. Résultats exprimés en µ l. O_2/mg.h.

Enfin, nous avons cherché à savoir si l'inhibition ne peut pas être diminuée lorsqu'on augmente la tension d'oxygène.

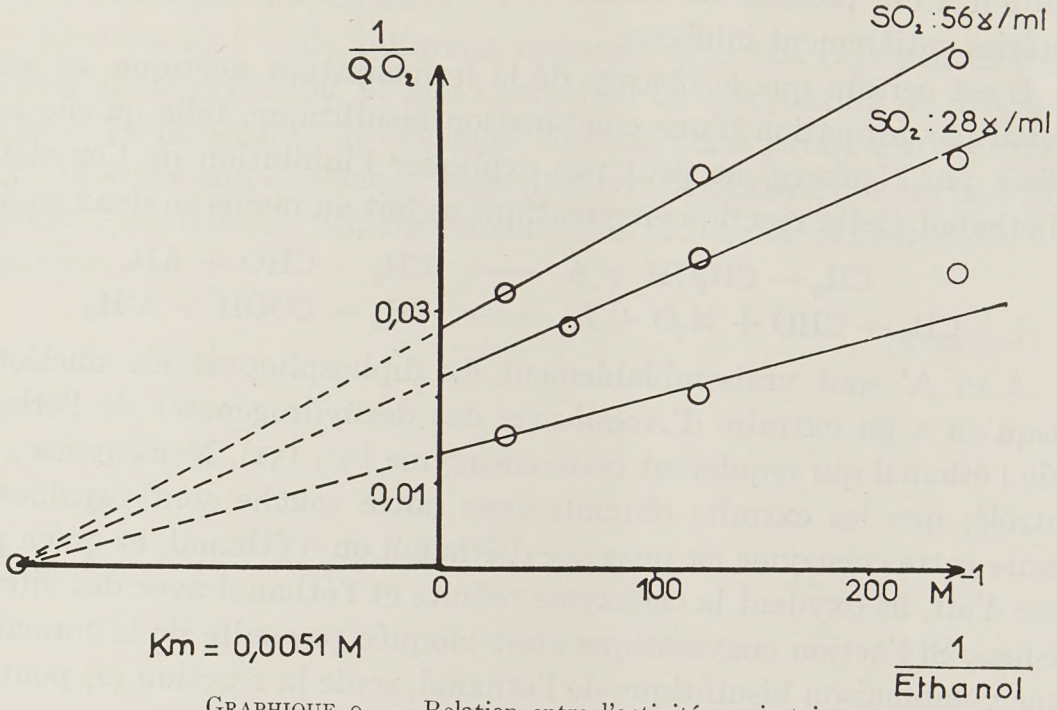
Le tableau XXIII donne les résultats d'une expérience où la respiration de bactéries inhibées par diverses doses de sulfite a été mesurée dans l'air et dans l'oxygène. Dans le cas des bactéries non inhibées, on remarque que la respiration augmente légèrement lorsqu'on passe de l'air

à l'oxygène. Les expériences antérieures, particulièrement celles de WIELAND et BERTHO (89), avaient indiqué la même valeur pour des expériences faites dans l'air et dans l'oxygène. Au contraire, le taux d'inhibition est tout à fait comparable dans les deux séries de mesures. Il semble donc que la tension d'oxygène n'intervienne pas dans le mécanisme de l'inhibition.

Quatre expériences différentes nous démontrent donc que le sulfite produit, dans les conditions où nous l'avons utilisé, une inhibition réversible, et que la réversibilité est excellente puisqu'elle peut atteindre 80 à 90 p. 100. On est donc amené pour expliquer ces résultats, à envisager l'existence d'une réaction facilement réversible entre le sulfite et certaines fonctions chimiques du système enzymatique d'*A. rancens*.

NATURE DE L'INHIBITION

Les données cinétiques sur l'oxydation de l'éthanol par les *Acetobacter* montrent que la réaction satisfait à l'isotherme d'absorption de



GRAPHIQUE 9. — Relation entre l'activité respiratoire et la concentration en sulfite et en éthanol.

LANGMUIR (53), dont la théorie de MICHAELIS-MENTEN n'est qu'un cas particulier. On a cherché à savoir comment se comporte le sulfite vis-à-vis de cette réaction.

Le graphique 9 représente la variation de l'inverse de la vitesse d'oxydation en fonction de l'inverse de la concentration en substrat, système de coordonnées introduit par LINEWEAVER et BURK (54). L'expérience a été faite avec des bactéries broyées, et répétée avec deux concentrations différentes d'inhibiteur.

On voit immédiatement que la constante apparente de dissociation du complexe substrat bactérie n'est pas modifiée, lorsqu'on ajoute du sulfite. C'est là, la propriété d'un inhibiteur non compétitif. Le sulfite se combine donc sur un centre de la bactérie différent de celui sur lequel se fixe l'éthanol. La constante de dissociation pour l'inhibiteur a été trouvée égale à 7 et 8 10^{-4} M dans ces deux expériences réalisées avec un extrait, à pH 3,8.

Discussion des résultats

L'action bactéricide de l'acide sulfureux était connue depuis longtemps. Il restait cependant à préciser s'il agissait comme destructeur de certains systèmes enzymatiques ou bien comme un inhibiteur réversible. Les expériences que nous avons rapportées démontrent que l'acide sulfureux doit être considéré comme un inhibiteur. Il est en effet actif à une très faible concentration ; dans les expériences réalisées à pH 3,8 les inhibitions de 50 p. 100 sont obtenues le plus souvent avec des concentrations voisines de 5 10^{-4} M. L'inhibition n'est pas due à une action destructrice, puisqu'il a été possible de restaurer jusqu'à 90 p. 100 de l'activité des bactéries entièrement inhibées.

Il est certain que le blocage de la fermentation acétique au stade éthanal par formation d'une combinaison bisulfitique, telle qu'elle a été réalisée par Neuberg, ne peut pas expliquer l'inhibition de l'oxydation de l'éthanol. Cette réaction enzymatique se fait au moins en deux stades :

$$CH_3 - CH_2OH + A \longrightarrow CH_3 - CHO + AH_2 \quad (1)$$

$$CH_3 - CHO + H_2O + A' \longrightarrow CH_3 - COOH + A'H_2 \quad (2)$$

A et A' sont vraisemblablement du diphosphopyridine nucléotide puisqu'on a pu extraire d'*Acetobacter* des deshydrogénases de l'éthanol et de l'éthanal qui requièrent cette coenzyme (50) (51). Nous avons aussi contrôlé, que les extraits obtenus avec notre souche sont capables de réduire cette coenzyme en présence d'éthanol ou d'éthanal, et qu'en présence d'air, ils oxydent la coenzyme réduite et l'éthanol avec des vitesses voisines. Si l'action enzymatique était bloquée par suite de la formation d'une combinaison bisulfitique de l'éthanal, seule la réaction (2) pourrait être inhibée et la consommation d'oxygène mesurée ne serait en aucun cas inférieure à la moitié de ce qu'elle est dans la réaction normale. Ensuite il faudrait s'attendre à ce que la réaction reprenne sa vitesse normale lorsque tout le sulfite est combiné. Or ce n'est pas ce qu'on observe. Au contraire la vitesse se stabilise après quelques minutes d'incubation à une valeur plus basse que celle du témoin sans sulfite, et il est aussi possible de produire des taux d'inhibition supérieurs à 50 p. 100.

Les recherches d'éthanal et de sa combinaison bisulfitique, que nous avons faites dans plusieurs expériences, montrent que ces composés se forment en faible quantité. L'expérience décrite dans le tableau XI indique

que, dans ce cas particulier, il s'est produit de l'éthanal en quantité suffisante pour combiner les deux tiers du sulfite. Il apparaît donc que l'accumulation de petites quantités d'éthanal en présence de sulfite est une chose certaine, mais, à pH 3,8, cette voie déviée du métabolisme ne représente qu'une valeur infime par rapport à l'acétate formé : exactement 1/250e dans cette expérience.

Des expériences ont montré que la combinaison bisulfitique de l'éthanal ne possède aucun pouvoir inhibiteur. Au contraire l'addition d'éthanal à des bactéries déjà inhibées fait cesser l'inhibition.

Enfin, d'après les connaissances déjà acquises concernant l'action du sulfite sur les protéines, on aurait pu penser que l'inhibition était due à une réaction de Clarke produisant la rupture des liaisons disulfures dans les protéines. Les essais d'inhibitions réalisés avec les bactéries, les débris et l'extrait montrent au contraire que le sulfite doit réagir principalement sur le système enzymatique. En effet, la présence de protéines non enzymatiques ou de protéines enzymatiques dénaturées par chauffage, ne modifie que très peu la concentration en sulfite qu'il faut atteindre pour obtenir une inhibition donnée.

En résumé, l'acide sulfureux apparaît dans nos expériences comme un inhibiteur réversible et non compétitif de l'oxydation de divers substrats et en particulier de l'éthanol. Son efficacité paraît surtout être due aux molécules non dissociées, mais il est vraisemblable que les ions SO_3H^- doivent y contribuer, principalement dans la zone de pH favorable à leur existence.

(à suivre)

RECHERCHES SUR LA VINIFICATION DES VINS DOUX NATURELS

PAR

M. FLANZY

Station centrale de Technologie des Produits végétaux, Narbonne

A. — ORIGINE ET OBJET DES ESSAIS

La vinification des vins doux naturels a pour objectifs : la fixation du rapport alcool acquis/sucre résiduaire à une valeur arbitraire, l'obtention aussi économique et rapide que possible de vins de hautes qualités gustative et commerciale aussi prolongées que possible.

Si pour le « Muscat » tout le monde est à peu près d'accord pour conserver l'arôme du fruit et, partant, maintenir au Muscat un caractère prolongé de jeunesse, les avis sont partagés avec le « Grenache ».

Certains apprécient la saveur *rancio* plus ou moins accentuée, qui s'éloigne du goût habituel du grenache. D'autres, au contraire, la réprouvent. Nous croyons que ceux-ci sont davantage près de la qualité, marquée à la foi par le facteur sapidité et par le facteur nutritionnel.

Les travaux de SEMICHON à la Station de Narbonne ont abouti, dans le passé, d'une part, à préciser la vinification des Vins Doux Naturels (1) ; d'autre part, à les distinguer analytiquement des Vins de Liqueur (2).

En outre, sur le plan fiscal et économique SEMICHON s'est efforcé de faire comprendre leur législation si complexe (3).

Les recherches sont reprises à la Station de Narbonne en 1934.

Elles ont délaissé délibérément l'étude du rapport alcool acquis/sucre résiduaire — Voici pourquoi :

Sans méconnaître pour autant son importance, qui est fondamentale dans la sensation gustative, elle ne pose aucun problème de recherche à l'œnologue — celui-ci peut à son gré en fixer les termes à partir d'une richesse initiale du raisin et une dose d'alcool exogène définie.

Mais l'égalité de ce rapport dans une série de vins issus d'une même masse de raisins aussi homogène que possible ne signifie pas une identité de sensations gustatives si des modalités de vinification ont été quelque peu différentes. Et ce sont précisément ces différences gustatives qui donnent en particulier au vin la qualité recherchée ou le défaut condamné, qui font qu'un vin est plus « harmonisé » qu'un autre, qu'il caresse le palais au lieu de le brutaliser, qu'il plaît ou déplaît.

C'est pourquoi nos préoccupations ont été concentrées sur le 2e objectif indiqué plus haut.

De 1934 à 1939 quelques travaux préliminaires cherchent à s'assurer si des techniques nouvelles, comme la « macération carbonique », peuvent être avantageusement envisagées. Quelques essais de laboratoire, complétés par des essais en cave particulière, montrent que le raisin « grenache » gagne à être vinifié par cette technique. Trois années successives d'essais ont confirmé les avantages particuliers des vins élaborés dans ces conditions : évolution satisfaisante des vins, sapidité plus agréable, commercialisation plus précoce. Mais les documents analytiques ne sont pas suffisants pour faire de l'ensemble un mémoire utile.

L'expérimentation systématique est reprise en 1943, non pas avec le grenache, mais avec le muscat. Il importait, en effet, de se rendre compte si, aussi bien que le grenache, le muscat se prêtait à la « macération » préalable du raisin. Ces travaux ont abouti à des conclusions satisfaisantes.

En 1948 et 1949, de nouvelles recherches sont effectuées avec le grenache gris. Ici encore les travaux sont menés à bonne fin.

Mais le problème des Vins Doux Naturels a un aspect fiscal si particulier, qu'il est indispensable de bien le connaître pour rendre plus explicite certains aspects techniques de ces recherches.

On a donc pensé que le mémoire technique, concernant les travaux de 1943, 1948 et 1949, devait être précédé d'une étude aussi complète que possible sur la réglementation des Vins Doux Naturels. On verra d'ailleurs que celle-ci est dominée par le problème de l'alcoolisation (4).

La partie technologique proprement dite constitue ainsi exclusivement la matière de ce mémoire. Celui-ci concerne donc les travaux entrepris en 1943 sur le « Muscat » et en 1948 et 1949 sur le « Grenache Gris ».

B. — ESSAIS 1943 SUR LE « MUSCAT »

I. — Objet des essais.

II. — Vinification habituelle.

1° Caractéristiques du moût.
2° Protocole expérimental.
3° Observations et manipulations.

III. — Vinification après macération carbonique préalable du raisin.

1° Macération et alcoolisation unique.

2° Vinification.

IV. — Examen et analyse des vins.

1° Coloration.

2° Dégustation.

3° Résultats analytiques.

V. — Discussion et conclusion.

I. — OBJET DES ESSAIS

Le MUSCAT utilisé est le muscat à petits grains, dit de Frontignan, récolté à Tuchan-Nouvelles pendant les vendanges 1943.

Les essais ont eu pour objet :

1° D'étudier dans le cas de vinification habituelle les modalités d'affusion d'alcool.

2° De rechercher les effets d'une macération carbonique préalable avant la vinification proprement dite.

3° Éventuellement les effets des lies de fermentation et du SO_2 sur la clarification des vins.

Les raisins nécessaires à ces essais furent cueillis le 11 octobre 1943 en réalisant une identité aussi grande que possible entre les deux lots.

II. — VINIFICATION HABITUELLE

1° Caractéristiques du moût.

Dans la masse des 15 kg de raisins réservés à cet essai, on a soigneusement séparé : d'une part, un lot de grains normaux ; d'autre part, un lot de grains passerillés, avec d'ailleurs l'intention de regrouper ultérieurement les jus correspondants pour la suite des essais. Cette séparation provisoire avait pour objet d'apprécier une différence de composition entre le raisin mur et le raisin passerillé.

Voici les valeurs respectives de la densité et de l'acidité (celle-ci est exprimée en acide tartrique par litre). A côté de la densité on a mentionné le « degré alcoolique » correspondant.

	Densité à 15°C	Degré alcoolique correspondant	Acidité totale en g/l. d'Ac. tartrique
Lot normal	1140	20°00	5
Lot passerillé	1170	25°00	3,75

Les jus ont été alors mélangés. On a eu un ensemble de 9 litres de jus ayant les caractéristiques suivantes :

Densité à 15°C	1150
Matières réductrices dosées en g/l	352
Degré alcoolique correspond (17 g/l)	20°60
Acidité totale en g/l d'acide tartrique	4,25

Tout ce jus fut abandonné à la fermentation alcoolique. Celle-ci débute très lentement le 12.

Le 14, la fermentation est nettement déclarée. Un microdosage donne un degré alcoolique acquis de 2°.

On fait alors 4 parts égales de 2 litres chacune de manière à doubler les deux essais d'alcoolisation envisagés.

Le jus restant est mis hors circuit expérimental mais est conservé à côté des essais.

2° Protocole expérimental.

On utilise exclusivement l'alcool neutre de rétrocession. Mais on met en comparaison l'affusion unique avec l'affusion fractionnée en 4 fois.

L'alcool neutre titre 95° à 15°C et possède 15 g de non alcool par hectolitre d'alcool pur.

Les essais d'alcoolisation unique sont numérotés 1 et 1 *bis*.

Les essais d'alcoolisation fractionnée sont numérotés 2 et 2 *bis*.

Voici la suite détaillée des essais réalisés au laboratoire à une température voisine de 20°C.

Alcoolisation unique.

Deux litres de moût en fermentation reçoivent 120 cm³ d'alcool à 95° le 14 octobre 1943. Cette quantité élève théoriquement le degré alcoolique de 5°,30.

On ne tient compte ni de la contraction ni de la température.

La fermentation est ralentie très nettement, mais ne paraît pas stoppée. Elle reprend, mais à une cadence très lente 48 heures après. Le 19, le dégagement gazeux est plus lent. Il est encore perceptible le 5 novembre c'est-à-dire 15 jours après. Cette fermentation est *languissante*, suivant le terme consacré.

Alcoolisation fractionnée.

Les deux litres de moût en fermentation reçoivent le 14 octobre 1943 seulement 30 cm³ d'alcool à 95°, identique à l'alcool employé dans les essais 1 et 1 *bis*. La fermentation paraît à peine ralentie — 12 heures après elle a repris son allure normale.

Le 19 octobre 1943, on ajoute un premier complément de 30 cm³ d'alcool. On note un ralentissement à peine sensible.

Le 22 octobre, nouvelle addition de 30 cm³ d'alcool. Ici le ralentissement est plus net, le retour à l'allure normale est tardif.

Le 26, on ajoute enfin la dernière fraction des 120 cm³ d'alcool. Ici, on note un arrêt de la fermentation à la deuxième heure qui suit cette alcoolisation. On peut admettre un effet de mutage.

Dans chaque essai on n'a relevé aucune différence avec son double. Par contre, l'allure des fermentations a été fort différente en passant de la série 1 (affusion unique)à la série 2 (affusion fractionnée).

Le 26 octobre 1943, les essais 1 et 1 bis ; 2 et 2 bis ; sont placés dans une salle à la température de 15° relativement constante avec des variations de ± 2°C seulement.

Les 4 flacons sont abandonnés, non bouchés, mais recouverts seulement d'un capuchon en papier.

3° Observations et manipulations.

On observe régulièrement jusqu'à fin novembre un très faible dégagement de CO_2 qui marque ou bien une fin de fermentation aussi longue que difficile, ou bien une désaturation du milieu en CO_2.

Le 23 février 1944, les essais 1 et 1 *bis* ; 2 et 2 *bis*, se présentent ainsi :

Une séparation nette entre le dépôt et une couche liquide bien limpide. Le liquide est légèrement ambré.

On bascule les flacons 1 et 2 de manière à remettre bien en suspension chaque dépôt dans son liquide et on abandonne au repos les deux essais. On relève de temps en temps — pendant 8 jours seulement — un dégagement gazeux.

Le 15 mars 1944, les dépôts sont reformés, les liquides sont bien limpides. On note une différence sensible de l'intensité colorante. En effet, la coloration des échantillons 1 et 2 est moins foncée que dans les échantillons 1 *bis* et 2 *bis*. Cette opération a produit une « clarification » très nette. On décante définitivement tous les échantillons.

C'est à ce moment que les échantillons 1 et 1 *bis* ; 2 et 2 *bis* sont comparés aux échantillons des essais de « macération carbonique ».

III. — VINIFICATION APRÈS MACÉRATION CARBONIQUE PRÉALABLE DU RAISIN

Le lot de raisin réservé à cet essai était de 20 kg. Toute cette masse a été soigneusement égrappée, mais en laissant en place sur le grain le bourrelet ; ceci de façon à ne pas déchirer la pellicule et à se placer dans les meilleures conditions expérimentales.

1° Macération et alcoolisation unique.

Les grains ont été mis dans un récipient (tank) en acier inoxydable pouvant être fermé. La plaque de fermeture est traversée par une tubulure plongeante en acier inoxydable reliée à un tube de CO_2.

Une deuxième tubulure de dégagement permet d'éviter toute surpression.

Pendant le remplissage on fait passer un courant de CO_2 de manière à chasser l'air contenu dans tout l'appareillage.

La mise en train, remplissage et mise sous atmosphère de CO_2 est terminée le 12 octobre 1943. Le récipient est placé dans une salle à 15°C.

Le 13, on fait à nouveau passer un courant de CO_2. En soulevant la plaque de fermeture on constate un tassement important avec présence de liquide. Une masse de grains éclatés, non mesurable, mais non négligeable, a laissé écouler une fraction de sa partie liquide. Celle-ci va naturellement subir l'action banale des ferments alcooliques. Mais la proportion de grains non éclatés est suffisante pour avoir de leur part une influence mesurable.

Le 16, on fait passer un courant de CO_2 pendant une minute.

Le 19, on constate qu'il y a une très légère surpression, ce qui est la preuve d'un départ de fermentation du jus écoulé. En outre, les grains en surface ont bruni. Ceci signifie, ou bien que l'anaérobiose n'a pas été rigoureuse, ou bien qu'il s'agit d'une réaction de brunissement sans relation avec l'air.

Pour ralentir et même empêcher cette fermentation on décide une affusion prématurée d'alcool. Celle-ci n'était pas prévue dans le protocole expérimental. On opère donc une affusion unique d'alcool à 95°, en quantité suffisante pour enrichir la totalité du moût de 4°,5 environ.

Comme on met en œuvre 20 kg de raisins et en supposant un rendement identique à celui de l'essai ordinaire, le calcul donne un volume de jus de :

$$\frac{9 \times 20}{15} = 12 \text{ litres}$$

On ajoute donc théoriquement :

$$\frac{12\,000 \text{ cm}^3 \times 4{,}5}{95} = 568 \text{ cm}^3$$

et pratiquement 600 cm³.

En même temps on fait passer un courant de CO_2 et on abandonne le tout jusqu'au 2 novembre 1943. Cette phase « macération » va donc durer 21 jours à une température voisine de 15°C.

2° Vinification.

Le 3 novembre on décuve.

On recueille, à part, 2 300 cm³ de jus. Sa densité est 1,065. Les grains sont écrasés à la main. On obtient une masse pulpeuse où la distinction entre jus et parties solides est impossible. Le volume de l'ensemble, très visqueux, atteint 11 500 cm³.

On réunit ce jus au jus de goutte. On obtient un volume total de 13,80 litres. L'ensemble est agité. On fait 4 parts égales de 2 litres. On obtient ainsi les essais couplés 3 et 3 *bis* ; 4 et 4 *bis*. Le reste du jus est mis hors circuit expérimental, mais il accompagne les séries 3 et 4.

Les essais 3 et 3 *bis* sont abandonnés à eux-mêmes.

Les essais 4 et 4 *bis* reçoivent chacun 4 cm³ de SO_2 à 50 g par litre correspondant à 100 mg de SO_2 total par litre de jus.

Ces 4 essais sont placés côte à côte au laboratoire.

Ces vins sont examinés le 23 février 1944. Pendant cette période la température du laboratoire a varié de 20° à 8° suivant l'heure et le jour.

Les échantillons 3 et 3 *bis* ; 4 et 4 *bis* présentent 2 couches : une couche supérieure liquide mince, une couche inférieure très bourbeuse occupant à peu près toute la masse. La décantation est impossible ; on opère par filtration. Les bourbes obtenues sont abandonnées et les liquides sont recueillis pour dégustation et analyses.

On procède à l'analyse de tous les échantillons.

IV. — EXAMEN ET ANALYSE DES VINS

L'examen porte sur la coloration et la dégustation.

1° Coloration.

Le lot 3 et 4 est moins coloré que le lot 1 et 2. Comme par ailleurs l'influence clarifiante des bourbes avait été notée pour la série 1 et 2, il semble que la différence de coloration doit être ici encore mise sur le compte des bourbes. Cet effet clarifiant paraît être tout à fait général.

Les échantillons sulfités 4 et 4 *bis* ont une coloration qui ne se différencie guère de celle des échantillons 3 et 3 *bis*. Par conséquent l'action décolorante de SO_2 n'est pas surajoutée à celle des bourbes.

2° Dégustation.

Celle-ci a été faite par le personnel de la Station qui n'avait pas participé aux essais.

Voici les résultats :

Vinification ordinaire.

1 *et* 1 *bis* (affusion unique) : parfumé, mais saveur alcoolique nette. Bon.

2 *et* 2 *bis* (affusion fractionnée) : parfumé, saveur alcoolique bien moins nette. Meilleur que le précédent.

Macération carbonique.

3 *et* 3 *bis* (affusion unique) : plus parfumé que le précédent. Plus fin, mais douceur moins prononcée.

4 *et* 4 *bis* (affusion unique) + SO_2. Parfum muscat moins caractérisé. Mais très bon.

Le classement par ordre décroissant est le suivant : 3 et 3 *bis* ; très près de 4 et 4 *bis* ; puis nettement séparée 2 et 2 *bis* et très près de 1 et 1 *bis*.

3° **Résultats analytiques.**

On a déterminé les éléments suivants : densité, matières réductrices, alcool acquis, acidités.

Le tableau I mentionne les résultats. En outre la quantité d'alcool exogène est indiquée.

TABLEAU I

	1	1 *bis*	2	2 *bis*	3	3 *bis*	4	4 *bis*
Densité à 18°,5	1085	1084	1050	1050	1027,5	1027	1028,5	1029
Matières réductrices dosées en g/l	228	226	145	144	91,25	91,25	92,5	93,0
Alcool correspondant (1)	13°,40	13°,40	8°,50	8°,50	5°,30	5°,30	5°,40	5°,40
Alcool acquis	10°,90	10°,85	15°,80	15°,75	14°,70	14°,65	15°,00	15°,00
Alcool total	24°,30	24°,25	24°,30	24°,25	20°,00	19°,95	20°,40	20°,40
Acidités totale	3,20	3,30	3,10	3,05	2,80	2,85	2,50	2,45
volatile	1,00	1,00	0,90	0,95	0,95	0,95	0,65	0,65
fixe	2,20	2,30	2,20	2,10	1,85	1,90	1,85	1,80

(1) Calculé sur la base de 17 g/l pour 1° d'alcool/l.

V. — **DISCUSSION ET CONCLUSION**

Les *degrés alcooliques* offrent quelques singularités.

Tout d'abord rappelons que le moût initial riche de 352 g de sucre avait donné un degré alcoolique correspondant égal à 20°60. En tenant compte d'une affusion exogène de 5°30 dans les séries 1 et 2, cela donne un total de 25°90.

Or, dans les séries 1 et 2, on note une différence sensible entre le degré alcoolique total calculé (25°90) et le degré réel (24°30). Le fait est

bien connu de tous les producteurs de Vins Doux Naturels. Mais cette différence est trop grande dans les autres séries puisqu'on note une perte de 5° environ. Comment l'expliquer?

Certes, on ne peut assurer que les masses de raisins originelles avaient une composition identique. Mais la façon dont l'échantillonnage a été fait permet d'admettre au maximum une différence de 5 à 10 p. 100 alors qu'elle atteint 20 p. 100 environ.

En réalité il faut tenir compte de la façon dont l'alcool exogène a été réparti. Dans le cas des essais ordinaires tout l'alcool d'affusion est contenu dans le moût expérimenté. Mais dans le cas des essais « macération » une certaine partie de l'alcool exogène est retenue par le marc de raisin puisque pendant tout le temps de macération une partie a imprégné les grains de raisin.

Il n'est pas possible de calculer exactement cette quantité, car l'analyse du marc n'a pas été faite.

Peut-on, malgré tout, reconstituer la plus grande partie de cette différence?

Rappelons que dans l'essai « macération » il a été impossible de distinguer le jus du marc. Indiquons, en outre, que dans le cas du « Muscat de Frontignan » 100 g de raisin donnent en moyenne 96 g de grains, qui à leur tour donnent environ 55-60 cm^3 de jus dont la densité est en moyenne de 1 110 (260 g de sucre).

Le calcul montre que théoriquement l'enrichissement aurait été de 4°20 dans l'essai de « macération », alors qu'il a été de 5°30 dans l'essai « ordinaire ».

Déjà nous avons une différence de 1°10 entre les deux essais.

Dans les conditions expérimentales qui ont réglé l'essai « macération » l'alcool d'affusion s'est réparti en parties à peu près égales dans la partie liquide analysée et dans les bourbes égouttées retenues par le filtre. Par rapport à l'essai ordinaire où tout l'alcool est concentré dans le liquide, c'est donc une dose approximativement égale à la moitié.

Pratiquement, l'enrichissement est de 2° à 2°5 seulement. A cette perte de 2° environ s'ajoute la différence de 0°8 indiquée plus haut.

D'autre part, le rendement alcoolique, dans le cas de « *macération carbonique* » est plus faible que dans le cas de « *Vinification ordinaire* », leur rapport est approximativement 17/18. C'est-à-dire que nous avons une différence de 1° pour 17°-18° d'alcool produit. Or, nous avons environ 12° produits par la fermentation alcoolique. La différence calculée est $\frac{1 \times 12}{18} = 0°66$.

Par ailleurs, sous l'effet du courant de CO_2, une certaine quantité d'alcool est entraînée, d'autant plus grande que le milieu est alcoolique. Or, celui-ci titrait au décuvage 25°. Au début de l'opération son titre

était beaucoup plus élevé, certainement voisin de 40°. Dans ces conditions on peut penser à une perte de l'ordre de quelques dixièmes de degré.

On arrive finalement par rapport aux vinifications habituelles à une diminution globale minimum de 4° environ dans l'essai « macération ». On peut considérer comme satisfaisant le bilan ainsi établi. Mais insistons sur le fait que ces conditions expérimentales sont exceptionnellement voulues ; on peut et doit éviter ces pertes dans la pratique de cette nouvelle technique de vinification.

Le bilan établi permet de dégager la conclusion suivante :

Si l'affusion d'alcool se fait en présence des parties solides du raisin, celles-ci conservent une partie non négligeable de l'alcool exogène. Dans la vinification des Vins Doux Naturels on a intérêt à faire cette affusion sur le jus seulement.

Discutons sur une autre singularité : la faiblesse du degré alcoolique acquis des échantillons 1 et 1 *bis*. Remarquons tout d'abord que les vins correspondants ont été analysés en mars 1944, c'est-à-dire avant les reprises habituelles de fermentation, quand les milieux sont loin du degré inhibiteur des fermentations alcooliques, soit 15° environ. Or, nous avons ici 11°. Et effectivement la partie du vin correspondant mise hors expérience, mais conservée à tout hasard a été marquée 1 mois après par une reprise de fermentation languissante qui en juin amenait le titre alcoolique à 13° seulement.

On ne peut imaginer une carence d'éléments biotiques puisque la matière première est la même dans les autres essais ; mais on peut penser qu'une addition brutale d'une telle masse d'alcool modifie sensiblement les propriétés tensioactives du milieu et que les levures en supportent les conséquences déprimantes. De toute façon l'analyse n'est pas assez complète pour envisager d'autres explications.

On peut s'étonner des différences de degrés alcooliques acquis entre les séries 2 d'une part ; 3 et 4 d'autre part. Elles s'expliquent en remarquant que dans la série 2 l'alcool a été ajouté en plusieurs fractions et que la dernière a été réalisée quand la fermentation a été sur le point de se terminer ; le degré limite naturel a alors été dépassé par cet apport exogène ce qui donne un degré voisin de 16.

Au contraire, dans les séries 3 et 4, c'est la fermentation alcoolique elle-même qui a permis d'atteindre les degrés trouvés puisque l'alcool exogène a été ajouté dès le début et dans des conditions bien différentes de celles qui ont marqué la série 1.

Les *Acidités* sont doublement remarquables. D'abord par la faiblesse générale de l'acidité fixe. Ceci caractérise le raisin « Muscat de Frontignan » et plus encore le degré de maturité atteint. Ensuite le titre encore faible des acidités fixes des vins de « Macération ». Cette diminution caractérise le mode de vinification « Macération Carbonique ».

La dose des *acidités volatiles* peut paraître élevée. Les petits volumes de vins expérimentés ne sont sans doute pas étrangers à ce résultat. Les essais 4 confirmeraient cette hypothèse puisque ces derniers ont reçu de l'anhydride sulfureux qui a dû contrarier l'action des ferments acétiques.

De tous ces résultats ont peut dégager les faits suivants :

— L'affusion d'alcool fractionnée a donné de meilleurs vins que l'affusion unique.

— La « Macération Carbonique » même avec une affusion unique d'alcool a donné un vin meilleur encore. La méthode est donc applicable au « Raisin Muscat » et démontre ainsi une généralité plus grande qu'on ne pensait.

— Les bourbes ont eu dans ces essais un effet clarifiant très net.

— L'anhydride sulfureux n'améliore pas la qualité gustative des vins.

— Sur le plan pratique on a intérêt à faire l'alcoolisation en dehors des constituants solides du raisin.

C. — ESSAIS 1948 SUR LE GRENACHE GRIS

I. — Objectifs des essais.

II. — Caractéristiques des produits expérimentés.

Le moût et les raisins.
Les alcools.
L'anhydride sulfureux.
L'acide ascorbique.

III. — Protocole expérimental.

Essais sur le moût faiblement fermenté.
Essais sur le moût fortement fermenté.
Essais sur les raisins avec macération carbonique préalable.
Modalités d'affusion et variation du titre alcoolique.

IV. — Résultats.

Résultats analytiques.
Dégustation.

I. — OBJECTIFS DES ESSAIS

Ces essais ont pour objectifs l'étude des facteurs suivants :

— l'alcoolisation (nature de l'alcool et des modalités d'affusion).

— l'influence des antioxygènes (SO_2 et acide ascorbique) aussi bien en cours de vinification que pendant l'évolution des vins.

— les effets préalables d'une macération des raisins en atmosphère carbonique.

Les recherches intéressant les deux premiers objectifs ont utilisé un même moût de raisin, dit moût ordinaire. Mais les mises en train de ces essais ont eu lieu à deux périodes différentes. Dans un premier cas, le moût en fermentation titrait 5° d'alcool acquis, dans l'autre environ 10°. C'est ainsi que l'on a pu appréciser l'influence du « moment d'affusion ».

Enfin, avec le raisin cueilli, le jour même du prélèvement du moût et après macération et ultérieurement l'extraction du jus, on a répété à peu près tous les essais effectués avec le moût ordinaire.

L'ensemble de ces essais, eu égard à la nature de la matière première, est partagé en trois grandes séries :

— La série du *moût faiblement fermenté* ;

— La série du *moût fortement fermenté* ;

— La série du *raisin macéré.*

Avant de détailler chacune d'elles indiquons les caractéristiques des produits mis en œuvre.

II. — CARACTÉRISTIQUES DES PRODUITS EXPÉRIMENTÉS

Le moût et les raisins

Le 9 octobre 1948 on a prélevé à Tuchan-Nouvelles le moût et les raisins nécessaires aux essais envisagés (moût ordinaire).

Le raisin a été mis directement, à la vigne même, dans les fûts métalliques réservés aux essais de macération carbonique.

Le tout, moût et raisin, a été apporté à la Station et placé en frigorifique en attendant la mise en expérience.

A la date du 9-10-48, le moût avait les caractéristiques suivantes :

Densité à 15°C	1105
Acide tartrique en g/l	4,50

Un échantillonnage du raisin donnait les caractéristiques suivantes :

Densité à 15°C	1103
Acide tartrique en g/l	4,40

On pourrait donc considérer comme identiques, quant à la composition du jus, le moût et le raisin.

Le 15 on notait dans le moût une légère fermentation avec une séparation nette des bourbes. A ce moment on homogénéisait et on faisait deux parts : l'une réservée aux essais sur le moût faiblement fermenté ; l'autre sur le moût fortement fermenté.

C'est le 20-10-1948 que les essais sur *le moût faiblement fermenté* étaient mis en train. Deux parts étaient faites, d'un côté la partie *la plus limpide*, qui dans ces essais portera le nom de *moût limpide*, de l'autre,

la partie la plus bourbeuse qui s'appellera *moût bourbeux*. Le moût avait les caractéristiques suivantes :

Densité à 15°C	1 069
Alcool acquis	5°00
Sucres dosés en g/l	187
Glucose en g/l	84
Lévulose en g/l	103

On remarquera le caractère « glucosique » de la fermentation alcoolique.

C'est le 17-11-1948 que les essais sur le *moût fortement fermenté* ont été mis en train. Ici on ne fait aucune séparation entre bourbes et moût. Mais on homogénéise au moment des prélèvements. Ce moût sera appelé *moût brut*. Il avait les caractéristiques suivantes :

Densité à 15°C	1 022
Alcool acquis	10°35
Sucres dosés en g/l	88
Glucose en g/l	23
Lévulose en g/l	65

Le caractère « glucosique » de la fermentation s'est encore accentué.

Les alcools.

On a mis en comparaison : l'alcool pur, une eau-de-vie de vin obtenue sous vide, un mélange à volumes égaux de moût expérimenté et d'alcool pur (alcool dénaturé).

Les caractéristiques de l'alcool et de l'eau-de-vie étaient les suivantes :

Alcool pur	Degré alcoolique	95°
	non alcool	15 g
Eau-de-vie	Degré alcoolique	68°
	non alcool	333,7 g
	Acides	18,5
	Aldéhydes	24,7
	Esters	124,5
	Alc. supér.	166,0
	Furfurol	0

Le mélange alcool-moût, appelé alcool dénaturé, avait la composition suivante :

	Théorique	Trouvé
	—	—
Degré alcoolique	47°	45°
Sucres	130	135

Les différences s'expliquent d'une part par la contraction du mélange, hydroalcoolique (135 g au lieu de 130) ; d'autre part, par l'évaporation d'une certaine quantité d'alcool (45° au lieu de 47°).

La dose d'alcool exogène a été fixée à 6° environ quel que soit l'agent alcoolisant utilisé.

L'anhydride sulfureux.

On a employé comparativement le sulfite de calcium et le métabisulfite de potassium. Il est facile de constater que des masses sensiblement égales de ces deux sels dégagent la même quantité de SO_2 et que celle-ci est pratiquement égale à la moitié de ce poids. On admettra donc ces relations pour calculer les doses de sel à utiliser.

L'acide ascorbique.

L'acide ascorbique est l'acide commercial.

III. — PROTOCOLE EXPÉRIMENTAL

Essais sur le moût faiblement fermenté.

Sur le *moût limpide* on a comparé l'alcool pur, l'alcool dénaturé et des affusions alternatives d'alcool pur et d'alcool dénaturé.

Pour *l'alcool pur* on a comparé seulement l'affusion unique à une affusion fractionnée (3 fois). Enfin, pour les affusions alternatives, on a débuté dans un cas avec l'alcool pur et terminé avec l'alcool dénaturé, dans l'autre cas, on inversait l'ordre des produits.

Dans chaque cas il y a eu 3 affusions :

Sur *le moût bourbeux* on a comparé l'alcool pur et l'alcool dénaturé et avec chacun d'eux l'affusion unique à l'affusion fractionnée en trois fois. Mais en outre, on a mis en comparaison pour chacun de ces essais, une série réalisée à la température de 15°C et l'autre à 30°C pendant toute la durée de la fermentation du moût. Cet essai de température avait été réalisé sur une partie des essais effectués sur le moût limpide.

On a ainsi mis en train 18 essais en flacons de 2,5 l contenant chacun 2 l de moût.

De plus, on a recherché sur les vins faits l'influence des antioxygènes (SO_2 et acide ascorbique) sur leur évolution ultérieure en employant des doses variables d'acide ascorbique (50 et 100 mg/l) et de SO_3 Ca (100 et 200 mg/l).

Cela nous a obligé à subdiviser les essais précédents, ce qui nous a donné en tout 36 essais.

Sur le moût fortement fermenté.

On a mis en comparaison l'alcool pur, l'alcool dénaturé et une Eau-de-vie de vin de 65°. Mais l'originalité de cette série est marquée par une étude comparée de l'action de SO_3 Ca et de S_2 O_7 K_2. Deux doses ont été expérimentées : 500 mg et 2 g/l pour chacun de ces sels.

En outre, ces essais conduits à la température de 15°C ont été tous répétés à la température de 30°C pendant toute la durée de la fermentation.

On a ainsi mis en train 22 essais, en flacons de 2,5 l contenant chacun deux litres de moût.

On a suivi l'évolution des vins mais sans procéder aux essais d'aération ou d'action d'antioxygènes.

Essais sur les raisins avec macération carbonique préalable.

Les fûts ou tanks chargés de raisins à la vigne, arrivés à la Station le 9 octobre 1948 sont aussitôt soumis à un courant de CO_2, mais d'une façon intermittente. Les alternances de passage et d'arrêt durant 1 heure.

On a répété cette opération quotidiennement jusqu'au 14 octobre inclus. Le 21 les deux tanks sont ouverts. Les raisins ne paraissent pas assez évolués. Les tanks sont refermés et le courant de CO_2 est établi comme précédemment mais pendant un jour seulement.

Le 27 les tanks sont définitivement ouverts. Les raisins sont donc restés dans cette atmosphère carbonique pendant 17 jours. La température a été de 15°C avec des variations de ± 2° seulement,

A l'ouverture il se dégage une bonne odeur aromatique musquée. Les raisins ont bien évolué en apparence.

On recueille 1,100 l par tank de jus de goutte, de densité à 15°C = 991. Ce jus a subi la fermentation alcoolique banale.

On presse les raisins. Le jus qui s'écoule, ou jus de presse, est réuni au Jus de goutte. On obtient une masse de 44 l pour l'ensemble des tanks.

L'analyse sommaire effectuée le 28, date de mise en train des essais macération a donné :

Densité à 15°C		1 043
Matières réductrices	153 g correspondant à	9°00 (1)
Alcool acquis		6°70
Alcool total		15°70
Glucose/lévulose		1,03

Avec ce moût de macération (appelé moût macéré) on a encore mis en comparaison la nature de l'alcool (alcool pur, deux eaux-de-vie et une eau-de-vie de piquette), les modalités d'affusion (unique ou fractionnée en 3 fois).

Mais pour la première fois, nous avons mis en comparaison dans la phase fermentation l'acide ascorbique à deux doses (100 et 500 mg/l) et le SO_2 Ca (250 mg/l). Ces corps ont été ajoutés dès la mise en train du moût.

En outre, si toutes les séries ont été conduites à 15°C, la plupart des essais ont été répétés à 30°C, ce qui nous a permis de compléter les essais précédents sur le facteur température.

(1) Calculé sur la base de 17 g/l pour 1° d'alcool/l.

Nous avons ainsi mis en train 18 essais en flacons de 2,5 l contenant 2 l de moût.

De plus, on a suivi d'une façon systématique l'évolution naturelle des vins, sans addition d'antioxygène, une moitié conservée en flacons pleins, l'autre moitié en flacons en vidange.

On a donc finalement eu à apprécier 36 essais.

Modalités d'affusion et variation du titre alcoolique.

L'affusion unique a été réalisée quand le milieu avait atteint une richesse alcoolique de 8 à 10°. Par contre, la première fraction de l'addition fractionnée a été faite dès le début, c'est-à-dire quand le milieu titrait 5° dans le cas du moût faiblement fermenté, 10° dans le cas du moût fortement fermenté. Les autres fractions ont suivi de telle sorte que la dernière a eu lieu quand le milieu avait environ 13°-14° d'alcool.

L'affusion continue a été réalisée par adaptation aux flacons en expérience d'une ampoule à robinet contenant la totalité de l'alcool exogène. L'écoulement était réglé de manière à réaliser tout l'écoulement en 10 jours.

En pratique, on n'a pas pu faire ainsi : des bulles de CO_2 s'opposaient à l'écoulement de l'alcool. On a alors procédé à un très grand nombre d'affusions successives de l'ordre de 1 cm³ chaque fois. Elles étaient séparées entre elles par un temps variable. Tout l'écoulement était terminé après 8 jours.

Précisons que tout en ajoutant les mêmes masses d'alcool on n'a pas tenu compte du titre différent de chacun des agents alcoolisants. On a donc finalement des volumes différents de liquide, donc un titre alcoolique différent.

Pour d'autres raisons une même masse d'alcool ajoutée à des volumes égaux de moût limpide et de moût bourbeux ne donnera pas un même titre alcoolique. Il faut, en effet, tenir compte, d'une part, du volume des matériaux solides constituant les bourbes, d'autre part, de l'alcool absorbé par ces matériaux. L'alcool exogène se répartit entre parties liquide et solide dans des proportions qui n'ont pas été établies.

Dans le cas du moût faiblement fermenté, voici l'exemple de calcul qui permet d'apprécier le degré alcoolique exogène.

Rappelons que :

— le moût expérimenté titre 5° d'alcool acquis et qu'on en prélève 2 litres.

— l'alcool pur titre 95° et on en utilise 150 cm³

— l'Eau-de-Vie titre 68° et on en utilise 220 cm³

— le moût dénaturé 45° et on en utilise 300 cm³

Dans le cas de l'alcool pur, la quantité d'alcool exogène élève le degré alcoolique de :

$$\frac{0,15 \times 95}{2,150} = 6°60$$

Dans le cas de l'Eau-de-Vie, le degré alcoolique est élevé de :

$$\frac{0,22 \times 68}{2,220} = 6°60$$

Dans le cas du moût dénaturé le degré alcoolique est élevé de :

$$\frac{0,3 \times 45}{2,3} = 5°80$$

En récapitulant l'ensemble de ces essais on constate que les facteurs suivants ont été étudiés, la plupart du temps avec plusieurs répétitions :

Dans la phase vinification :

— Nature de l'alcool (alcool pur, alcool dénaturé avec le moût, Eaux-de-Vie)
— Modalités d'affusion (cadence, moment)
— Actions des antioxygènes (SO_2 et Acide ascorbique)
— Action comparée de SO_3 Ca et S_2 O_7 K_2
— Influence de deux températures de fermentation (15° et 30°C)
— Influence des bourbes
— Influence d'une macération carbonique préalable des raisins.

Ultérieurement :

— Action de l'air (flacons en vidange)

C'est finalement un ensemble de 94 échantillons qui ont été mis en train.

On a comparé l'allure des fermentations alcooliques, leur durée. On a suivi l'évolution des vins et périodiquement dégusté et analysé ces vins. L'analyse a été sommaire pour quelques vins, aussi complète que possible pour d'autres. On a ainsi groupé une somme de documents significatifs.

IV. — RÉSULTATS

Ceux-ci comprennent l'analyse et la dégustation. Les résultats analytiques portent sur les déterminations suivantes : alcool acquis, sucre et alcool en puissance, alcool total, pouvoir rotatoire des sucres, rapport P/α, produits secondaires de la fermentation alcoolique : glycérine, 2-3-butylène-glycol, acétoïne, acide acétique, acide succinique, éthanal.

Pour ne pas surcharger le mémoire, tous les dosages concernant les produits secondaires de la fermentation alcoolique feront l'objet d'un mémoire distinct. Nous mentionnons seulement ici le degré alcoolique acquis et total, la dose de sucre.

Résultats analytiques :

Ceux-ci comprennent le degré alcoolique, la dose de sucre, le degré total. Ils sont inscrits dans le tableau I et II.

TABLEAU I

Résultats analytiques avec le moût faiblement fermenté.

	N° de l'essai	Température	Nature alcool	Nombre d'affus.	Degré alcoolique	Sucre résiduaire	Degré total
Moût brut	B-8	15°C	pur	1	16°30	47 g	19°05
	B-9	15°C	dénaturé	1	16°10	41,3 g	18°50
	B-1	15°C	pur	3	14°65	98,7 g	20°45
	B-2	15°C	mixte	3	14°60	83,6 g	19°50
	B-3	15°C	mixte	3	15°10	86,2 g	20°70
	B-4	15°C	dénaturé	3	15°00	80,0 g	19°70
	B-6	15°C	pur	6	15°05	69,0 g	19°10
	B-6 bis	30°C	pur	6	14°00	78,0 g	18°50
	B-7	15°C	mixte	6	15°00	63,3 g	18°70
	B-5	15°C	pur	continue	15°25	80,6 g	20°00
Moût bourbeux	B-11	15°C	dénaturé	1	16°50	22,0 g	17°80
	B-12	30°C	dénaturé	1	15°50	39,4 g	17°80
	B-13	15°C	pur	1	15°70	39,0 g	18°00
	B-14	30°C	pur	1	15°05	50,5 g	18°05
	B-15	15°C	pur	3	15°60	43,0 g	18°10
	B-16	30°C	pur	3	15°10	52,5 g	18°10
Moût limpide	B-17	15°C	pur	3	16°00	59,0 g	19°40
	B-18	30°C	pur	3	15°60	64,0 g	19°30

Dégustation :

La dégustation, opération délicate entre toutes, a été confiée au personnel de la Station qui n'avait pas participé aux essais. Tous les échantillons étaient anonymes, tous les opérateurs savaient ce qu'était un Vin Doux Naturel.

Dans la dégustation de ces vins, le rapport Sucre/Alcool a une très grande influence. Il peut varier dans des proportions sensibles. Or, certains dégustateurs préfèrent la « douceur » à « l'alcoolicité » et réciproquement.

Ces préférences ne devraient pas jouer. Aussi avons-nous orienté la dégustation en donnant les directives générales suivantes :

— Essayer d'apprécier toute sensation gustative autre que les saveurs « doux », « alcool » et « acidité ».

— En outre, noter dans quelle mesure l'alcool exogène disparaît dans la masse, c'est-à-dire, le degré « fondu » de l'alcool. Un Vin Doux Naturel est en effet d'autant mieux savouré qu'il est difficile de distinguer l'alcool des autres constituants.

D'une façon très générale, le degré total des moûts brut et limpide est plus élevé que celui du moût bourbeux.

La raison est donnée par les explications fournies plus haut sur le rôle des matériaux solides dans la répartition de l'alcool exogène.

Tableau II

Résultats analytiques avec le moût fortement fermenté.

	N°	Température	Anti-oxygènes	Nature alcool	Nombre d'aff.	Degré alcooli.	Sucre résiduaire	Degré Total
Vinification ordinaire	30	15°C	—	Pur	1	16°60	58,8	20°05
	31	15°C	SO_3Ca	Pur	1	16°20	75,5	20°60
	32	15°C	—	Dénaturé	1	16°00	57,0	19°30
	33	15°C	SO_3Ca	Dénaturé	1	15°95	63,5	19°65
	34	30°C	—	Pur	1	15°80	80,0	20°50
	35	30°C	SO_3Ca	Pur	1	15°60	81,0	20°40
	36	30°C	—	Dénaturé	1	14°70	82,3	19°55
	37	30°C	SO_3Ca	»	1	15°30	80,0	19°95
	38	15°C	$S_2O_7K_2$	Pur	1	15°70	82,7	20°55
	39	30°C	»	»	1	15°65	83,5	20°55
	40	15°C	»	»	1	15°45	81,5	20°25
	41	15°C	SO_3Ca	»	1	15°00	83,6	19°90
	43	15°C		Eau-de-vie 65°	1	17°05	54,4	20°25
Macération Carbonique	47	15°C	A. Asc.	Pur	1	15°60	89,5	20°85
	48	30°C	»	»	1	18°20	49,5	21°10
	49	15°C	2 A. Asc.	»	1	14°80	91,5	20°15
	50	30°C	»	»	1	17°00	66,0	20°90
	51	15°C	»	»	1	14°80	104,0	20°90
	52	30°C	»	»	1	18°80	41,8	21°25
	53	15°C	—	Pur	1	15°40	91,5	20°80
	54	15°C	—	Eau-de-vie	1	15°40	88,8	20°60
	55	15°C	—	»	1	15°20	95,0	20°80
	56	15°C	—	»	1	15°80	92,5	21°25
	57	30°C	—	»	1	18°20	35,6	20°30
	58	30°C	—	»	1	19°40	38,4	21°65
	59	15°C	—	Alcool	3	16°00	81,5	20°80
	60	15°C	—	Eau-de-vie	3	16°20	62,9	19°90
	61	15°C	—	Mixte	3	16°40	75,5	20°85
	62	15°C	—	»	3	16°40	69,0	20°05

Également, dans le cas de l'emploi de l'alcool dénaturé, ou de l'utilisation à la fois de l'alcool pur et de l'alcool dénaturé (mixte), le degré total est plus faible que lorsqu'on emploie l'alcool pur.

Cela s'explique par les concentrations différentes des produits alcoolisants.

Il est très difficile de dégager d'autres observations. En particulier, au sujet de la température de fermentation. On pourrait déduire qu'une température élevée déplace le rapport Sucre/Alcool vers une valeur plus élevée, c'est-à-dire rend le vin plus doux et moins alcoolique.

Malheureusement, ces résultats sont infirmés par d'autres séries.

On note souvent des différences sensibles dans la valeur du rapport Sucre/Alcool en passant dans la phase fermentative de 15° à 30°C.

Il semblerait que dans ce dernier cas, le degré alcoolique soit plus faible et en contrepartie, la dose de sucre plus élevée.

L'influence de l'anhydride sulfureux paraît sur ce point plus sensible. On note avec l'emploi de l'anhydride sulfureux un degré alcoolique plus faible et un reliquat de sucre plus important.

La conclusion pratique est que la « douceur relative » pourrait être augmentée, si ces résultats étaient confirmés par addition d'anhydride sulfureux à raison de 200 mg/litre, quant à l'action de la température la conclusion est réservée.

Alcoolisation.

Sur le plan gustatif, la supériorité des affusions fractionnées d'alcool sur l'affusion unique a été une nouvelle fois constatée.

Indiscutablement, le vin paraît plus équilibré. L'alcool est plus fondu, le vin paraît, à degrés sucre et alcool identiques, moins alcoolique.

Sur un plan pratique, les vins d'affusion « fractionnée » sont plus rapidement commercialisables que les autres. Quant à l'affusion continue, elle donne des vins qui sont au moins au niveau des vins d'affusion fractionnée.

Le meilleur agent alcoolisant a été, dans le premier âge du vin, l'alcool dénaturé, puis l'alcool pur.

Avec le temps, les différences sont de moins en moins marquées. Après 3 ans l'Eau-de-Vie de vin produite par distillation sous vide apparaît être un excellent agent alcoolisant.

Ces différences sont modifiées par les modalités d'affusion et le moment de l'affusion. Elles sont d'autant plus grandes que l'affusion est tardive et plus faibles que l'affusion est précoce.

Action des bourbes.

La bonne influence des bourbes est indiscutable. Elle est nette sur la clarification du vin fait et sur la tenue ultérieure du vin. Indiquons encore que la fermentation a été plus rapide en présence des bourbes. Ajoutons que les vins correspondants sont plus « harmonieux » que les autres, les divers constituants paraissent plus fondus.

Dans l'action clarifiante, il semble que l'on doive distinguer deux effets essentiellement différents. D'une part, une action réductrice capable de se manifester sur la coloration des vins en la ramenant vers des nuances plus claires. D'autre part, une action précipitante par adsorption de fines particules en suspension.

Nous précisons qu'il s'agit là de deux hypothèses de travail. Des études correspondantes méritent d'être faites.

La macération carbonique.

Elle modifie la saveur habituelle des vins de Grenache mais dans un sens plaisant. Les vins sont plus aromatisés, plus agréables à boire. Ils paraissent plus évolués, sans qu'on puisse dire qu'ils sont plus vieillis. Et, conséquence fort importante, ces vins sont plus rapidement commercialisables. Ils conservent plus longtemps une coloration plus claire.

Au contraire, les vins vinifiés sans macération carbonique ont une couleur qui fonce et qui les différencie de plus en plus des vins « macérés ». En même temps que « fonce » la nuance, une saveur amère devient de plus en plus perceptible. En 1955, cette saveur amère n'était pas notée dans les vins « macérés ».

Les anti-oxygènes : ont un effet sensible.

Tout d'abord l'anhydride sulfureux : Au cours de la fermentation alcoolique, on note au début un léger retard, au point que la fermentation est achevée dans la série SO_2, huit jours après les autres séries. Mais la coloration des essais SO_2 est plus claire. En outre avec SO_3 Ca on a un dépôt cristallin très net de tartrate de Ca.

Au cours de la conservation des vins, l'addition de SO_2 produit une régression nette de la couleur vers des teintes encore plus claires. Cette régression est persistante.

Ensuite, l'acide ascorbique : Sur l'allure de la fermentation alcoolique, on ne note aucune variation significative. La coloration du vin est moins foncée que dans les autres séries (Série SO_2 exceptée). En outre, et ceci est très important, la saveur a un fruité remarquable.

Au cours de la conservation du vin, l'acide ascorbique produit sur la couleur le même effet régressif que le SO_2. Mais par la suite, la couleur évolue vers des teintes plus foncées. Quelques mois après, les vins sulfités ont encore une teinte claire alors que la série acide ascorbique est nettement moins claire.

Si donc ce « brunissement » est dû à la formation de substances mélanoïdiques, il faudrait en conclure que seul l'anhydride sulfureux inhibe cette formation. En fait, l'absence du dosage final de l'anhydride sulfureux et des formes de l'acide ascorbique ne permet pas de faire une déduction dans ce sens.

Quant à la comparaison entre SO_3Ca et $S_2O_7 K_2$, la préférence doit être donnée au sel calcique qui donne gustativement un vin plus agréable.

La température

Elle a une influence nette et, par certaines constatations, inattendue.

Les fermentations ont été plus rapides à 30° qu'à 15°, ce qui est

régulier. Mais on a remarqué l'absence de la saveur Grenache habituelle dans les essais à 15° ; alors qu'elle apparaissait dans les essais à 30° C. Les essais à 15° ont, par contre, une saveur fruitée fort agréable, qui fait penser à un cépage autre que le Grenache, réputé pour prendre rapidement la saveur rancio caractéristique.

Si ces résultats étaient confirmés, il faudrait conclure que la saveur à laquelle on est habitué est davantage une conséquence de la technique utilisée qu'une caractéristique du raisin.

On a constaté encore un arôme étrange dans les essais sulfités, même modérément, surtout avec le métabisulfite de potassium (250 mg/l). Cet arôme est assez difficile à définir. On pense à l'arôme agréable de champignons.

A 15° cet arôme n'apparaît pas.

Faut-il conclure qu'il est dû à des dérivés du soufre qui se produiraient par transformation réductrice du SO_2 à 30°C et non pas à 15°?

L'hypothèse mérite d'être vérifiée par des essais systématiques sur un point aussi important.

La mise en vidange des vins ne les améliore pas :

Leur couleur devient plus foncée, leur saveur prend rapidement une pointe de rancio, préférée toutefois par certains dégustateurs. Les vins sulfités ou additionnés d'acide ascorbique résistent plus longtemps, mais moins que les vins ayant subi l'action des bourbes.

De l'ensemble de tous ces essais, on peut dégager les indications générales suivantes :

1° *L'alcoolisation fractionnée est préférable* à l'alcoolisation unique. Quant à la nature de l'alcool, les résultats sont fonction et de la période à laquelle le vin est apprécié et des préférences du consommateur. Mais l'alcool dénaturé (mélange alcool-moût) paraît devoir être préféré.

2° *Les bourbes ont un effet bénéfique indiscutable* aussi bien sur la clarification et la tenue ultérieure du vin que sur sa valeur gustative.

3° Des doses, même modérées, d'anhydride sulfureux sont plutôt inutiles qu'utiles. Et si la température est élevée cet effet est même désagréable. Un « brunissement » prématuré des vins est toutefois retardé. A ce titre l'anhydride sulfureux a une action plus prolongée que l'acide ascorbique.

4° Si une température trop basse provoque une fermentation lente, par ailleurs, elle donne des vins plus fins et fruités et, en définitive, des vins relativement plus doux.

5° La mise en vidange ne doit pas être systématique et sera évitée dans la généralité des cas.

D. — ESSAIS 1949 SUR LE GRENACHE GRIS

I. — Objet des essais.
II. — Caractéristiques des produits expérimentés.
Le moût de raisin.
Les alcools.
III. — Protocole expérimental.
Alcoolisation.
Influence de SO_2.
Température.
Influence des bourbes.
Essais de clarification.
IV. — Résultats. Observations et dégustation.
Résultats analytiques.
Dégustation.
V. — Conclusion.

I. — OBJET DES ESSAIS.

Les facteurs suivants ont été étudiés :

— L'alcoolisation (nature de l'alcool et les modalités d'affusion) ;

— La température de fermentation ;

— L'action de SO_2 pendant la vinification ;

— L'action des bourbes.

Mais on a tenu compte des observations relevées au cours des essais antérieurs.

Le *facteur alcoolisation* a porté sur l'étude comparée de l'alcool pur, d'une eau-de-vie et d'une alcoolisation mixte (alcool-eau-de-vie et eau-de-vie-alcool) ; l'alcoolisation était dans chaque cas unique ou une alcoolisation fractionnée en 6 fois et 4 fois.

On a abandonné $S_2 O_7 K_2$ et essayé seulement $SO_3 Ca$ qui a donné des résultats meilleurs.

Enfin, pour éviter les inconvénients déjà signalés de la différence de titre entre les alcools utilisés, ils ont été amenés à un même degré par dilution de l'alcool pur, jusqu'au titre de l'eau-de-vie.

En plus des essais réalisés jusqu'à présent, ceux de 1949 sont marqués par des essais de clarification sur une partie des vins obtenus.

L'ensemble des travaux comprend donc les chapitres suivants :

— Alcoolisation par l'alcool pur et eau-de-vie ;

— Température de fermentation (15-30°) ;

— Influence de SO_3Ca pendant la vinification ;

— Action des bourbes sur la vinification et la tenue ultérieure des vins ;

— Essais de clarification des vins.

II. — CARACTÉRISTIQUES DES PRODUITS EXPÉRIMENTÉS

Le moût de raisin.

Le moût nécessaire à tous ces essais a été prélevé le 8 octobre 1949 à l'égouttoir du Domaine de Tuchan-Nouvelles.

Ce moût de Grenache Gris avait alors les caractéristiques suivantes :

Densité à 15°	1 116
Sucre dosé en g/l	272
Acidité tartrique en g/l	5

Ce moût a été aussitôt transporté à la Station, placé au frigorifique à T = 10°6 C et stocké en cet endroit jusqu'à la mise en train des essais.

Celle-ci a eu lieu le 4-11-1949. Sous l'action du froid le moût brut s'était divisé : d'une part en moût clair (couche supérieure) et un dépôt de bourbes (couche inférieure).

On a recueilli une masse suffisante de moût clair. Celui-ci avait les caractéristiques suivantes :

Degré alcoolique acquis	2°4
Sucre dosé en g/l	228
Alcool correspondant	13°4
Acidité tartrique en g/l	4,30

Les alcools.

L'alcool pur était de l'alcool de rétrocession titrant 95° et possédant seulement 15 g de non alcool.

L'eau-de-vie préparée au laboratoire à partir de vins normaux avait les caractéristiques suivantes :

Degré alcoolique à 15°C	62°
Non alcool :	
Acidité	69,5
Aldéhydes	15,0
Ethers	128,5
Alc. Supérieurs	228,0
Furfurol	0
	441,0

III. — PROTOCOLE EXPÉRIMENTAL

Alcoolisation.

Le degré d'alcoolisation avait été fixé à 8° environ. Théoriquement pour un volume de 2 litres de moût le calcul donnait pour 8° : 166 cm³ d'alcool à 96° et 258 cm³ d'eau-de-vie à 62°.

Pour faciliter les mesures on a employé : d'une part 180 cm³ d'alcool

à 96°, d'autre part, 300 cm³ d'eau-de-vie à 62°. Dans le premier cas le degré d'alcoolisation a été de 8°65, dans le deuxième cas de 9°30.

Pour avoir dans les deux cas le même volume final l'alcool pur a été ramené au titre de l'eau-de-vie. On a donc employé dans tous les cas 300 cm³ ou d'alcool dilué ou d'eau-de-vie et le volume final a été uniformément égal à 2,300 litres. Tout ceci ne tient pas compte des réductions de volume dues à la contraction hydroalcoolique et l'évaporation inévitable.

— 20 essais ont été mis en train :

Les essais n° 76, 78, 90 ; 92, 94, 80, 82 ; ont été alcoolisés par l'eau-de-vie :

— en une fois les n° 78, 94, 82

— en 4 fois le n° 90

— en 6 fois tous les autres essais

Les essais n° 77, 79, 91, 93, 81, 83, 84, 85, 86, 87 ont été alcoolisés par l'alcool pur dilué.

Les n° 79, 95, 83, 84, 85, 86, 87 en une fois, le n° 91 en 4 fois, et les autres essais en 6 fois.

— Enfin, dans les essais n° 88 et 89, l'alcoolisation faite en 6 fois a été mixte ; pour le n° 88 l'eau-de-vie d'abord, l'alcool ensuite ; pour le n° 89, l'alcool d'abord, l'eau-de-vie ensuite.

L'*affusion unique* s'est produite quand le milieu avait une densité voisine de 1 040-1 050.

L'*affusion fractionnée* a débuté quand la densité du milieu était voisine de 1 090.

Voici, en exemple, le détail des affusions successives dans l'échantillon n° 76 :

4 Novembre 1949 : moût de densité à 15°C = 1 090 + 50 cm³ d'eau-de-vie à 62°.

10 Novembre 1949 : Fermentation nette, mais lente.

L'analyse donne à ce moment :

Densité à 15°C	1066
Alcool acquis	6°90
Sucre dosé	207 g

On ajoute la *deuxième fraction* de 50 cm³ d'eau-de-vie.

12 Novembre 1949 : Densité à 20°C = 1 059 — Addition de la troisième fraction d'eau-de-vie de 50 cm³.

13 Novembre 1949 : Addition de la quatrième fraction d'eau-de-vie.

15 Novembre 1949 : Densité à 20°C = 1 052 — Addition de la cinquième fraction.

16 Novembre 1949 : On constate un léger dégagement gazeux

20 Novembre 1949 : Densité à 15°C = 1048.

27 Novembre 1949 : Densité à 15°C = 1045. Addition de la sixième et dernière fraction d'eau-de-vie.
La fermentation paraît arrêtée.

Pour les essais « alcool » les affusions fractionnées ont eu lieu aux mêmes densités.

Les dates ont été légèrement différentes, car dans la série alcool, la fermentation a été un peu plus lente que dans la série eau-de-vie. C'est le 5 décembre 1949 que la sixième affusion a eu lieu, la densité était seulement de 1 048.

Voici un autre exemple, mais constitué par les séries : affusion unique et alcool dilué — essai 79.

Mise en train le 4 novembre 1949.

11 novembre 1949 : Densité à 20°C = 1071.
16 novembre 1949 : Densité à 16°C = 1065.
20 novembre 1949 : Densité à 13°C = 1060.
27 novembre 1949 : Densité à 13°C = 1056.
5 décembre 1949 : Densité à 14°C = 1052.
— C'est à ce moment qu'a lieu l'affusion unique d'alcool.

Influence de SO_2.

Les essais des années précédentes avaient démontré la supériorité sur le plan gustatif de SO_3Ca sur le $S_2O_7K_2$. On s'est donc limité au SO_3Ca.

Deux doses ont été expérimentées : 800 mg et 1 600 mg de SO_3 Ca pour 2 litres de moût chaque fois. Cela correspondait respectivement à 200 mg et 400 mg de SO_2 par litre.

Les essais ont été mis en train le 4.11.1949, comme dans les essais précédents. Mais l'addition de SO_3 Ca a été effectuée le 10.11.1949.

Les moûts avaient alors les caractéristiques suivantes :

Densité à 15°C	1 072
Alcool acquis	5°60
Sucre dosé en g/l	180 g

L'alcoolisation faite en une affusion unique a été opérée lorsque la densité avait atteint 1 044 :

— Le 5 décembre 1949 dans les séries à 800 mg de SO_3 Ca ;

— Le 10 janvier 1950 dans les séries à 1 600 mg de SO_3 Ca (essais 84, 85, 86, 87).

Température.

On a répété certains essais précédents, mais à la température de 30°C. Dans ces conditions on a pu comparer les effets des deux températures 15° et 30° sur la fermentation des vins (essais 80, 81, 82, 83).

La température de 30°C a été maintenue pendant toute la durée

de la fermentation. Ensuite, tous les vins, aussi bien les séries à 15° que les séries à 30°, ont été groupés dans le même local à la température de 15°-20°C.

Remarquons qu'en répétant tous les essais précédents à 30°C on a pu aussi bien comparer à des températures différentes les effets de l'alcoolisation et de SO_2.

Influence des bourbes.

Les essais des années précédentes avaient montré le rôle des bourbes sur la clarification des vins. C'est au cours des essais de 1949 qu'une expérimentation systématique a été effectuée.

Tous les essais précédents avaient été effectués sur le moût décanté, limpide, conservé en frigorifique. On disposait ainsi d'un reliquat de bourbes, ou plus exactement de moût bourbeux laissé au frigorifique. C'est celui-ci qui a constitué la matière première de nos expériences.

On a mis en train de nouvelles séries d'essais comparables aux essais d'alcoolisation (modalités et nature). Seul le moût limpide était remplacé par le moût bourbeux.

On a opéré sur les mêmes volumes bruts, c'est-à-dire avec 2 litres par bocal de moût comme unité expérimentale. En réalité le volume réel liquide était légèrement inférieur de 10 p. 100 environ.

Comme les quantités d'alcool et d'eau-de-vie ajoutées étaient les mêmes, l'alcoolisation a donc été théoriquement plus grande. En contrepartie, les bourbes ont retenu une certaine quantité d'alcool. Il est donc difficile de savoir, avant analyse, si le bilan est finalement positif ou négatif.

Les essais ont débuté le 8.11.1949 à la température de 15°. A ce moment, le moût centrifugé avait une densité à 15°C égale à 1 042.

On a procédé aussitôt à la première affusion d'alcool ou d'eau-de-vie dans les séries à affusion fractionnée. Et dans la série à affusion unique, celle-ci a été effectuée à la densité égale à 1 037.

Ici encore les essais ont été décantés le 27 janvier 1950 (essais n° 92, 93, 94, 95).

Essais de clarification.

Nous avons indiqué que les échantillons de tous les essais précédents avaient été décantés le 27.1.1950. Quelles que soient les modalités de ces essais, tous les échantillons avaient été placés dans un même laboratoire à la température de 20°C (± 2°).

La première dégustation faite ce jour-là avait été suivie d'une deuxième dégustation le 21.4.1950.

A ce moment tous les échantillons, sans exception, sont louches,

de coloration plus ou moins foncée, avec un dépôt brun foncé plus ou moins abondant. Toutefois, on peut nettement distinguer deux groupes :

— d'une part, les échantillons les plus foncés, qui sans exception ont le dépôt le plus abondant ;

— d'autre part, les échantillons les moins foncés. Dans ce groupe on situe uniquement les essais « sulfités » et les essais « bourbes ». Ceux-ci sont les moins colorés et le dépôt y est le moins abondant. Il est même pratiquement négligeable.

Coloration et dépôt sont dus à une casse oxydasique inhérente à la qualité du raisin et, partant, du jus correspondant. Quant à la coloration restante, on peut penser que la réaction de MAILLARD y participe.

On a précisé, plus haut, que tous les essais étaient faits en double. Ils constituaient ainsi deux ensembles parallèles et identiques. L'essai de clarification a porté sur les deux ensembles, à l'exception des essais « sulfités » et « bourbeux ».

On l'a réalisé avec un collage à la gélatine à raison de 50 mg/l. de gélatine. Mais on opère de deux façons :

— Le premier ensemble est « collé » après séparation du dépôt. On agite et on abandonne au repos du 21 au 25.4.1950.

— Le deuxième ensemble est « collé », sans séparation du dépôt. On agite avec gélatine et dépôt. On abandonne au repos du 21 au 25.4. 1950.

IV. — RÉSULTATS : OBSERVATIONS ET DÉGUSTATION

Tous les échantillons avons-nous dit ont été décantés le 27 janvier 1950 et dégustés aussitôt. Une deuxième dégustation suivie d'analyse a eu lieu en juillet 1950.

Résultats analytiques.

Comme dans les essais des années précédentes, l'analyse comporte l'appréciation de l'alcool acquis et en puissance (sucre résiduaire) et des produits secondaires de la fermentation alcoolique.

Dans ce mémoire, nous nous limitons aux doses d'alcool et de sucre. Les autres résultats entreront dans le mémoire exclusivement analytique qui suivra.

Ces résultats sont classés en 4 tableaux :

Tableau I : Nature de l'alcool et modalités d'alcoolisation.
Tableau II : Influence des bourbes.
Tableau III : Influence de la température.
Tableau IV : Influence de l'anhydride sulfureux.

Nos résultats présentent une régularité qui n'apparaissait pas aussi nette dans les essais précédents.

Si les essais eau-de-vie ont un degré plus élevé cela est dû à une quantité d'alcool exogène légèrement plus grande ainsi que nous l'avons mentionné dans le chapitre « alcoolisation ».

TABLEAU I

Nature de l'alcool et modalités d'alcoolisation.

N° de l'essai	Densité au moment de l'affusion	Nature de l'alcool	Nombre d'affusions	Degré Alcool acquis	Sucre résiduaire	Alcool total
76	1 045	Eau-de-vie	6	15°30	106	21°95
77	1 048	Alcool	6	14°90	113	21°50
78	1 050	Eau-de-vie	1	15°50	113	22°10
79	1 052	Alcool	1	15°25	106	21°50
88	1 047	Eau-de-vie Alcool	6	14°05	129	21°60
89	1 043	Alcool Eau-de-vie	6	15°00	114	21°70
90	1 058	Eau-de-vie	4	14°35	132	22°10
91	1 059	Alcool	4	14°20	126	21°60

Rappelons que ces essais ont eu pour objet des appréciations avant tout gustatives. C'est pourquoi les affusions, malgré les modalités différentes, se sont efforcées d'atteindre un même degré d'alcool acquis.

On note malgré tout quelques différences dues précisément à ces modalités qu'il est très difficile de rendre expérimentalement identiques.

TABLEAU II

Influence des Bourbes.

Échantillon de référence	N° de l'essai	Densité au moment de l'affusion	Nature de l'alcool	Nombre d'affusions	Degré Alcool acquis	Sucre résiduaire	Alcool total
76	92	1 027	Eau-de-vie	6	17°25	83,2	22°15
77	93	1 028	Alcool	6	17°50	78,1	22°00
78	94	1 037	Eau-de-vie	1	17°20	74,0	21°50
79	95	1 037	Alcool	1	17°65	64,0	21°40

Les courbes de fermentation ne sont guère significatives dans les conditions où elles ont été établies. Il n'en serait vraisemblablement pas de même si des mesures plus rapprochées avec dosage de sucre et d'alcool avaient été faits avant et après chaque affusion d'alcool.

Ceci pourrait être fait à l'occasion de nouvelles recherches où l'allure de la fermentation serait systématiquement étudiée.

On peut être frappé par la valeur élevée du degré alcoolique acquis. La comparaison des densités au moment des affusions explique les diffé-

rences avec les échantillons de référence. Ici encore les éléments analytiques envisagés ne donnent aucune indication originale.

TABLEAU III

Influence de la température.

Échantillon de référence	N° de l'essai	Densité au moment de l'affusion	Nature de l'alcool	Nombre d'affusions	Degré Alcool acquis	Sucre résiduaire	Alcool total
76	80	1 042	Eau-de-vie	6	13°45	142	21°80
77	81	1 044	Alcool	6	13°00	142	21°35
78	82	1 042	Eau-de-vie	1	15°30	111	21°80
79	83	1 038	Alcool	1	15°50	102	21°50
84	85	1 044	Alcool	1	15°10	112	21°65
86	87	1 045	Alcool	1	15°30	106	21°50

Autant pour les essais 80-81 on pourrait conclure à une action nette de la température sur le rapport Sucre/Alcool, autant les essais 78-79 obligent à se tenir sur une extrême réserve. Ici encore pas de résultat significatif quant au facteur étudié.

TABLEAU IV

Influence du SO_2.

Échantillon de référence	N° de l'essai	Densité au moment de l'affusion	Nature de l'alcool	Nombre d'affusions	Degré Alcool acquis	Sucre résiduaire	Alcool total
79	84	1 048	Alcool	1	15°95	100	21°90
83	85	1 044	—	1	15°10	112	21°65
79	86	1 048	—	1	15°50	106	21°70
83	87	1 045	—	1	15°30	106	21°50

Ici encore il est assez difficile de se prononcer.

Si, dans certains cas, il semble que le rapport Sucre/Alcool a tendance à augmenter avec la présence de SO_2, on ne peut tout de même être pas catégorique.

Dégustation.

Tous les échantillons, avons-nous dit, ont été décantés le 27.1.1950, appréciés une première fois ce jour-là. Voici le détail des observations et résultats pour chacun des facteurs étudiés :

Alcoolisation :

Aucune différence appréciable n'a été notée dans l'allure de la fermentation alcoolique. Notons seulement que les fermentations ont été lentes et leur fin échelonnée du 27.11.1949 au 5.12.1949.

La première dégustation comparative a été faite le 27.1.1950 à l'instant même de la décantation. Les observations suivantes sont consignées :

1° Tous les échantillons ont un louche plus ou moins prononcé.

2° Les vins provenant des affusions fractionnées sont plus agréables que les autres. Ces derniers paraissent plus « alcooliques ». On donne la préférence à l'affusion fractionnée.

3° Les vins de la série Eau-de-Vie ont une saveur eau-de-vie très nette. Elle n'est généralement pas appréciée. Aussi donne-t-on la supériorité aux vins correspondants de la série alcool.

La conclusion est donc que l'alcoolisation à l'alcool neutre est préférable à l'alcoolisation par eau-de-vie.

Une deuxième dégustation faite le 21.4.1950 a permis de noter les faits suivants :

1° Tous les échantillons sont louches de couleur foncée, et cela avec des gradations irrégulières. On ne peut accuser ni la nature de l'alcool, ni les modalités d'affusion. Il s'agit bien comme on le verra par la suite d'une casse oxydasique.

2° Une évolution très nette apparaît dans le sens amélioration pour tous les essais. En particulier, les échantillons « affusion unique » paraissent moins alcooliques. Mais la supériorité est encore aux essais « affusion fractionnée » et à un degré moindre aux essais « alcool ».

Une troisième dégustation le 20.2.1952 permet de constater que les différences notées dans la dégustation précédente sont bien atténuées. Il semble même que la série « Eau-de Vie » est préférée à la série « alcool ». Quelles que soient ces nuances, il est net que les essais d'affusion fractionnée sont déjà commercialisables, alors que ce point de maturation n'est pas encore atteint pour les séries d'affusion unique.

Le 12.6.1955, *donc 6 ans après*, a eu lieu *la quatrième et dernière dégustation*. L'amélioration notée aux dégustations précédentes s'est poursuivie.

— Les séries « affusion unique » sont commercialisables. Mais il apparaît d'une façon très nette que les séries « Eau-de-Vie » sont préférées aux séries « Alcool ».

— Quant à la série alcoolisation « mixte » les résultats s'intercalent entre ceux de la série « eau-de-vie « et de la série « alcool ».

Toutefois, à la première dégustation la série « mixte » eau-de-vie-alcool paraît supérieure à la série « mixte », alcool-eau-de-vie.

Au contraire, à la troisième dégustation la série « mixte » alcool-eau-de-vie est préférée à la série mixte eau-de-vie-alcool.

Influence de SO_2.

Dès le début de ces essais, on note un ralentissement sensible de l'allure de la fermentation alcoolique. Le retard, par rapport aux essais

précédents réalisés à 15°C, est de 3 semaines environ pour la série à 800 mg et 7 semaines pour la série à 1 600 mg.

On peut toutefois considérer qu'à la date du 27.1.1950 les fermentations sont terminées. C'est à cette date que les décantations et observations sont faites, comme dans les essais précédents.

D'une façon tout à fait générale :

— les séries « SO_2 » ont une coloration plus claire que les séries précédentes

— Les vins des séries « SO_2 » sont plus *durs* que les autres et la série la plus sulfitée, a, en outre, un arrière-goût désagréable, caractérisé pour certains par un « goût de soufre », pour d'autres par un « goût putride ».

— ces défauts de dureté et d'arrière-goût, sont plus accentués dans la série à 30° que dans la série à 15°C.

Avec le temps ces défauts s'atténuent. Et au moment de la *troisième dégustation*, le 20.2.1952 on note ceci :

— les colorations des séries « SO_2 » ne sont plus différentes des colorations des autres séries.

— les vins sulfités sont indiscutablement moins souples que les vins des autres séries. D'une façon générale ce sont les vins les moins appréciés.

A ce moment, on peut conclure que SO_2 n'a pas amélioré la vinification de ce type de vin.

Cette conclusion a été confirmée au moment de la dernière dégustation effectuée de 12.6.1955 en remarquant toutefois que les différences constatées le 20.2.1952 étaient très notablement atténuées.

Influence de la température de vinification.

On a d'abord constaté que les fermentations étaient nettement plus rapides à 30° qu'à 15°, ce qui confirme bien un fait tout à fait banal.

A la date du 18.11.1949, elles étaient pratiquement terminées, alors qu'il faut attendre environ 10 à 15 jours encore pour la série à 15°. Mais voici les observations les plus frappantes effectuées le 27.1.1950.

1° La coloration des vins dans la série à 30° est moins foncée que dans la série à 15°.

2° Les vins paraissent moins « alcoolisés » dans la série à 30° que dans la série à 15°. Par contre ces derniers sont nettement plus fruités.

Les dégustations successives opérées aux dates choisies pour la série précédente marquent une amélioration sensible avec le temps. A 30° les différences entre affusion unique et affusion fractionnée sont moins marquées que dans la série à 15°. Finalement, au moment de la troisième dégustation le 20.2.1952, les avis sont unanimes sur un point et partagés sur un autre. Tous les dégustateurs s'accordent pour préférer les essais aux affusions fractionnées. Par contre, les avis sont partagés sur la supé-

riorité ou l'infériorité des essais « Eau-de-Vie » sur les essais « Alcool pur ».

L'unanimité est encore faite sur un point. Les essais à 15° sont plus « fruités » que les essais à 30°, où la sensation « rancio » est plus sensible. Si donc les avis sont partagés quant au classement relatif, une différence apparaît nettement ayant à l'origine une différence de température de vinification.

A la dernière dégustation cette différence n'est presque plus sensible. A quelques nuances près on préfère en définitive les vins obtenus par affusion fractionnée et à la température de 15° C.

Influence des bourbes.

Voici les observations qui ont pu être notées :

1° La fermentation alcoolique a été beaucoup plus rapide dans la série « bourbes » que dans une quelconque de toutes les autres séries. Elle était, dans cette série, pratiquement terminé le 20.11.1949 après avoir duré environ 15 jours contre 3 à 4 semaines dans les autres séries.

2° D'une façon très générale les vins des essais « bourbes » ont des colorations bien plus claires que celles des vins de toutes les autres séries, série « SO_2 » comprise. En outre, ces vins sont plus limpides.

3° Tous les vins, sans exception, sont plus mœlleux. Les sensations « alcooliques » si nettes dans les séries à affusion unique sont ici plus atténuées. Indiscutablement les bourbes améliorent la vinification de ces vins.

Avec le temps les évolutions notées dans les autres séries sont encore constatées ici.

En définitive, les vins sont plus rapidement « terminés » et conservent davantage leur fruité. On pourrait dire que leur vie de pleine maturité se trouve en quelque sorte prolongée davantage dans la série « bourbes » que dans les autres séries.

A ce titre, c'est au contraire les séries SO_2 qui paraissent supporter moins bien une longue conservation.

Clarification.

D'une façon très générale la clarification est plus rapide dans la série où le collage a été effectué en présence du dépôt.

Par contre, les colorations ne sont guère différentes. Elles sont aussi peu accentuées dans chacune des deux séries. On peut donc dire que très nettement la gélatine a absorbé la matière colorante brune.

Indiscutablement les dépôts ont favorisé le collage. L'explication peut être trouvée, soit dans un phénomène d'attraction par les particules du dépôt, soit par sa structure physico-chimique.

Les échantillons ainsi traités sont décantés le 25.4.1959 et aban-

donnés à eux-mêmes à côté des échantillons « sulfités » et « bourbeux ».

Ici encore on a procédé à des dégustations le 20.2.1952. Le collage n'a pas donné aux vins une plus-value gustative. Au contraire, les vins collés paraisssent moins complets, l'alcool ressort davantage. Seule l'apparence a été améliorée.

Avec le temps cette seule différence s'atténue pour disparaître entièrement constate-t-on à la dégustation du 12.6.1955.

CONCLUSION

La composition des vins est avant tout fonction du moment de l'affusion. Les autres facteurs étudiés n'ont pas donné pour le rapport Sucre/Alcool des différences significatives.

Sur le plan gustatif l'affusion fractionnée s'est révélée supérieure à l'affusion unique. Mais quant aux valeurs relatives de l'alcool et de l'Eau-de-Vie les résultats sont assez discutés. De toute façon les différences s'atténuent avec le temps.

Avec les bourbes les vins sont plus rapidement élaborés et conservent plus longtemps leurs qualités premières. En outre, les bourbes ont un effet clarifiant très net. C'est la confirmation des essais antérieurs.

L'anhydride sulfureux a retardé la fermentation, mais surtout il a empêché pendant un certain temps le brunissement du vin. Toutefois, sur ce point les bourbes ont eu un effet non seulement aussi intense mais en outre plus prolongé.

La température a une influence très nette. Le passage de 15° à 30° substitue remarquablement au caractère de fruité le caractère grenache habituel. Ces résultats confirment ceux qui avaient été obtenus l'année précédente.

C'est donc le problème de l'origine de l'arôme grenache qui est posé.

Le collage à la gélatine, s'il clarifie indiscutablement le vin, n'améliore pas sa sapidité, au contraire.

E. — CONCLUSION GÉNÉRALE

Les recherches faisant l'objet de ce mémoire se sont préoccupées exclusivement de l'influence sur la qualité et l'évolution des vins du facteur alcoolisation, de l'action de constituants endogènes (bourbes), de produits exogènes (SO_2 et acide ascorbique), enfin des effets d'une macération carbonique préalable des raisins.

De l'ensemble de tous ces travaux, échelonnés de 1943 à 1949, on peut dégager les indications générales suivantes :

— La *nature de l'alcool* reste un facteur discuté. En bien des cas, l'alcool neutre paraît être préféré, en certains autres, les eaux-de-vie de

vin semblent donner un meilleur résultat. Les eaux-de-vie de marc doivent être proscrites, car elles laissent un arrière goût « sui generis » désagréable.

— Le *facteur temps* a une très grande influence sur l'action de l'alcool car les différences notées au début de l'élaboration du vin s'atténuent à mesure que sa conservation se poursuit. Mais de toute façon, l'utilisation de l'alcool dénaturé (mélange moût + alcool) est préférable à l'alcool pur de rétrocession. A ce sujet, il faut proscrire l'emploi d'alcool titrant 100° si le mélange azéotropique générateur est constitué par le benzène. Cette restriction n'existe pas si le mélange est fait avec la glycérine. Ces observations résultent de constatations faites au cours de vinifications de VINS DOUX NATURELS.

— Les *modalités d'affusion* constituent un facteur fondamental. D'une façon tout à fait générale, l'affusion fractionnée est préférable à l'affusion unique ; quant au moment des affusions, celles-ci sont conditionnées par la valeur recherchée du rapport Sucre/Alcool.

C'est ainsi que pour le « MUSCAT » les affusions doivent être concentrées au début de la fermentation ; pour le « GRENACHE » elles doivent débuter quand le milieu titre environ 5° d'alcool et s'échelonner jusqu'à la fin de la fermentation. Pratiquement ces affusions doivent aider à régulariser la fermentation alcoolique, c'est-à-dire se produire chaque fois que la fermentation aurait tendance à s'accélérer.

Dans le cas de « VINS DOUX NATURELS DE MACÉRATION » une partie non négligeable de l'alcool exogène est emportée par les matériaux solides, ce qui réduit d'autant le degré alcoolique acquis. Il faut donc, pour un même degré final, ou faire l'alcoolisation après séparation du marc, ou ajouter une quantité plus élevée d'alcool. De toute façon l'alcool du marc peut être récupéré.

— Les *bourbes* normales, naturellement présentes au moment de la fermentation et au premier soutirage, ont une influence très nette sur les qualités définitives du vin.

Non seulement les vins sont meilleurs, car ils paraissent plus harmonieux et plus coulants, mais leur présentation est plus agréable et leur conservation améliorée. La vinification du moût brut est donc à conseiller de préférence au moût débourbé. La fermentation est plus précoce.

— L'*anhydride sulfureux*, qui retarde la fermentation du moût, est d'autant moins recommandable que ses effets antioxygène sont remplis aussi bien et mieux par les bourbes. En outre, on évite certaines saveurs désagréables qui apparaissent quand la température d'élaboration a été plus voisine de 30° que de 15°.

— L'*acide ascorbique* a un effet antioxygène appréciable, mais fugace. Ici encore, les bourbes ont une efficacité aussi grande et plus prolongée.

Il semble qu'une température voisine de 15 à 20° de la fermentation alcoolique est préférable à une température égale ou supérieure à 30°.

Aussi bien pour le « MUSCAT « que pour le « GRENACHE », la *macération préalable* des raisins constitue un progrès indiscutable. Les vins obtenus, généralement meilleurs, sont plus rapidement faits, donc commercialisables plus tôt.

En résumé, ces travaux mettent en évidence les avantages d'une affusion alcoolique fractionnée, des bourbes et de la macération carbonique.

Elle met encore en évidence les inconvénients de l'anhydride sulfureux et les effets singuliers de températures même moyennes.

Si nous considérons à présent les résultats obtenus par DEIBNER (L.) et BENARD (P,) d'abord sur l'alcoolisation en phase gazeuse (5), ensuite sur les traitements thermiques de Vins Doux Naturels (6), on peut conclure que les sujets sur lesquels des recherches peuvent encore être fructueuses sont l'alcoolisation continue, la température de cette alcoolisation et les facteurs de maturation des vins.

On constatera, enfin, que le problème du surmutage, qui n'est pas un problème fondamental, n'a pas été étudié ici. Il ne peut modifier en rien les conclusions données à ces travaux.

Reçu pour publication, le 24 juin 1959.

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

(1) SEMICHON (L.). — Conseils pratiques pour la préparation des Vins de Liqueur, des Vins Doux Naturels et des Mistelles. *Revue de Viticulture*, **32**, 711, 1909.
SEMICHON (L.). — Une évolution dans la préparation des Vins de Liqueur. *C. R. Ac. Agr.*, **22**, 72, 1936.
(2) SEMICHON (L.). — L'analyse des Vins de Liqueur. Signification du Rapport P/α. *Ann. Fals. Fraudes*, **18**, 286, 1925.
(3) SEMICHON (L.). — Les Vins de Liqueur. Préparation. Régime fiscal et commerce. *Rev. de Viticulture*, **35**, 269 et la suite, 1911.
SEMICHON (L.). — Sur la réforme du régime fiscal des Vins de Liqueur. *Progr. Agri. et Vit.*, **54**, 104, 1910.
(4) FLANZY (M.). — Élaboration des Vins Doux Naturels. Réglementation et alcoolisation. *Ann. Techn. Agr. de l'I. N. R. A.*, **8**, 81-100, 1959.
(5) DEIBNER (L.) et BENARD (P.). — Recherches sur la maturation des Vins Doux Naturels. *Ann. Techn. Agr. de L'I.N.R.A.*, **5**, 357-377, 1956.
(6) DEIBNER (L.) et BENARD (P.). — Effets des traitements thermiques à l'abri de l'air sur les qualités des Vins Doux Naturels. *Ann. Techn. Agr. de l'I. N. R. A.*, **6**, 421, 1957.

ÉTUDE DES POSSIBILITÉS D'UTILISATION EN TECHNOLOGIE D'UNE LEVURE A DÉFICIENCE RESPIRATOIRE

(mutant « petite colonie »)

PAR

P. GALZY (1)

Station de Technologie agricole,
Centre de Recherches Agronomiques du Midi,
École Nationale d'Agriculture, Montpellier.

I. — Introduction.

II. — Matériel et méthode.

III. — Essais au laboratoire.

a) Étude sur milieu à base d'extrait de levure;
b) Étude sur Jus de raisin;
c) Étude de la formation de l'acidité volatile;

IV. — Essais industriels.

a) Essais de levurage 1957;
b) Essais de levurage 1958;

V. — Conclusion.

VI. — Bibliographie.

I. — INTRODUCTION

La mutation « petite colonie » a été décrite pour la première fois par EPHRUSSI, HOTTINGUER et CHIMENES (1). Une souche de levure de boulangerie étalée sur un milieu gélosé à teneur en sucre limitante présente un certain nombre de colonies de petite taille. Les clones obtenus à partir de ces petites colonies conservent leur caractère au cours de la multiplication par voie végétative. La petite taille des colonies est due à une baisse

(1) Travail effectué avec la collaboration technique de Mme BIZEAU.

du rendement de croissance d'après TAVLITZKI (2). SLONIMSKI (3) a montré que les cellules mutantes étaient caractérisées par une déficience respiratoire. Cette déficience est due à l'abolition de la formation de plusieurs constituants du système des cytochromes (4-5).

SLONIMSKI (6) a montré qu'il y avait perte par la levure mutante de la cytochrome oxydase, des cytochromes *a* et *b*, ainsi que de la succino-cytochrome *c* déshydrogénase de l'α glycéro-phosphate déshydrogénase et de la $CoIH_2$ cytochrome *c* réductase. La respiration due aux cytochromes ($a + a_3$) a donc disparu : une respiration résiduelle existe encore mais elle est très faible. En anaérobiose stricte, les levures normales se comportent comme les mutantes. Outre les enzymes ci-dessus, le cytochrome *c* et la lacticocytochrome *c* déshydrogénase disparaissent.

L'étude du déterminisme héréditaire de la biosynthèse des enzymes respiratoires a été réalisée par EPHRUSSI et ses collaborateurs (7-8). Le caractère normal de la respiration est conditionné chez la levure par la présence simultanée d'un facteur héréditaire cytoplasmique et d'au moins un facteur héréditaire chromosomique : le facteur cytoplasmique est particulaire et autoreproductible, il est indépendant du gène mendelien pour sa reproduction mais en dépend pour son fonctionnement. La mutation « petite colonie » peut être due à la perte du facteur cytoplasmique (petite végétative) ou à la mutation du gène (petite ségrégante). La mutation « petite colonie » peut être induite par l'acriflavine (9) : on obtient dans ce cas des mutants du type « petite végétative ». L'influence de divers facteurs sur le taux de mutation de la levure en présence d'acriflavine a été étudiée par MARCOVITCH (10). SLONIMSKI (11) a récemment attiré l'attention sur les avantages possibles que les levures à déficience respiratoire pourraient présenter en technologie.

L'importance des modifications de l'équipement enzymatique des « petite colonie » laisse prévoir des changements dans la nature et la quantité des produits secondaires de la fermentation (acide acétique). L'absence de respiration permet d'espérer également un accroissement du rendement en alcool. Dans ces conditions, il nous a paru intéressant d'effectuer une étude des possibilités d'utilisation des levures à déficience respiratoire dans les industries agricoles. Nous y avons été encouragé par M. le Professeur NÈGRE qui pensait que le résultat de ce travail serait susceptible d'intéresser plus spécialement la distillerie.

II. — MATÉRIEL ET MÉTHODE

a) Matériel biologique

Nous avons utilisé deux souches normales de *Saccharomyces cerevisiae*.

— Beaujolais (B) isolée par VENTRE dans un vin de Beaujolais (12).

— BM souche issue de la précédente par mutation pour la résistance à la canavanine (13).

Chacune de ces levures a été cultivée en tube à essais sur milieu naturel (jus de raisin) en présence de dose d'acriflavine variant de 0,001 à 0,01 mg par ml. Après croissance, la levure en prolifération est étalée à la surface d'un milieu de culture gélosé (100 colonies environ par boîte). La composition du milieu gélosé est telle que la teneur en glucose constitue le facteur limitant de la croissance ; sa composition est la suivante :

Glucose	5 g
Yeast extract Difco	5 g
Gélose	30 g
Eau distillée	1 000 ml

Les cellules mutantes donnent des colonies de petite taille. Nous avons mis à l'étude deux clones de « petite colonie » ; l'une est issue de B, l'autre de BM. Nous les désignerons respectivement par BP et BMP.

Nous avons vérifié que ces souches présentaient réellement une déficience respiratoire et avaient perdu en particulier la possibilité de respirer et de se multiplier sur les substrats non glucidiques (acide lactique, acide acétique, etc.).

b) Techniques analytiques

L'alcool a été déterminé par la méthode FLANZY (14). L'acidité volatile est dosée selon JAULMES et exprimée en gramme d'acide sulfurique par litre. La nature des acides gras volatils est déterminée par analyse chromatographique. Pour cette détermination, on distille 50 ml de vin auquel on ajoute 5 ml d'eau dans un appareil de DUCLAUX ; on recueille 50 ml de distillat qui sont neutralisés par l'éthylamine. On utilise ensuite la méthode qualitative de chromatographie sur papier décrite par JOLIVET (15). Les sucres (exprimés en g/litre) sont dosés par la méthode de Gabriel BERTRAND. Enfin, nous avons calculé les rendements alcooliques des diverses cultures en les exprimant en grammes de sucre par litre nécessaires pour former un degré d'alcool.

c) Contrôle du levurage

Les levures sauvages que l'on trouve dans la nature peuvent respirer et poussent sur un milieu de culture, où le substrat carboné est l'acide lactique. Au contraire, les levures à déficience respiratoire ne peuvent pas pousser en l'absence de glucide fermentescible. Cette propriété permet de contrôler la croissance d'une part, des levures indigènes, d'autre part, d'une levure à déficience respiratoire utilisée comme levain.

Deux milieux sont utilisés :

a) Milieu glucosé

Glucose	5 g
Yeast extract	5 g
Gélose	30 g
Eau q.s.p.	1 000 ml

b) Milieu à base d'acide lactique

Acide lactique pur	10 ml.
Yeast extract Difco	5 g.
Gélose	30 g.
Eau q. s. p.	1.000 ml.

pH réglé à 5 ; stériliser 20 minutes à 120°.

Les milieux sont coulés en boîte de Pétri et mis à sécher à 40° pendant 48 h avant utilisation.

Toutes les levures poussent sur le premier milieu ; seules les levures indigènes poussent sur le deuxième.

Le nombre de levures à déficience respiratoire est obtenu par la différence des deux résultats.

On effectue des dilutions de 10 en 10 (1 ml dans 9 ml) sur eau physiologique, puis on étale sur boîte de Petri 0,1 ml de chaque dilution (en utilisant une boîte de milieu *a* et une de milieu *b*).

III. — ESSAIS AU LABORATOIRE

Nous avons vu que les différences entre souches normales et souches à déficience respiratoire n'apparaissent qu'en présence d'air ; nous avons donc opéré dans des conditions où l'aération ne constituait pas un facteur limitant. Les cultures sont effectuées dans des erlenmeyers de 1 litre contenant 200 ml de liquide ; elles sont agitées (80 oscillations par minute, amplitude de 7 cm) pendant 5 jours. On les ensemence avec 5 ml d'une préculture faite avec le même milieu.

a) Étude sur milieu à base d'extrait de levure

Nous avons d'abord comparé les souches sur un milieu susceptible de donner une fermentation rapide. Ce milieu avait la composition suivante :

Glucose	85 g
Yeast extract Difco	5 g
Eau	1 000 ml
Stérilisation 20 minutes à 120°.	

Une première série de résultats est donnée dans le tableau I ; l'expérience a été répétée dans des conditions identiques (tableau II).

L'analyse chromatographique effectuée sur ces diverses cultures montre que l'acidité volatile est due à l'acide acétique.

Avant de discuter les résultats il convient de signaler que les souches B et BM ont des génotypes extrêmement voisins et doivent donc donner des résultats du même ordre. Il en est donc de même des souches BP et BMP.

TABLEAU I

Culture agitée sur milieu à base d'extrait de levure.

Souche	Sucre résiduel	Acidité volatile	Alcool	Teneur en sucre (g/l) donnant 1° d'alcool
B	4 g	1,82	3°8	21
BP	2 g	0,10	4°3	19
BM	8 g	1,66	3°9	20
BMP	2 g	0,15	4°4	19

TABLEAU II

Culture agitée sur milieu à base d'extrait de levure.

Souche	Sucre résiduel	Acidité volatile	Alcool	Teneur en sucre (g/l) donnant 1° d'alcool
B	1 g	0,46	3°9	21,5
BP	1 g	0,20	4°2	20
BM	1 g	0,05	3°8	22
BMP	1 g	0,15	4°3	19,5

Les résultats cités appellent quelques remarques :

— Les levures à déficience respiratoire ont donné un rendement en alcool supérieur à celui des levures normales.

— Les levures à déficience respiratoire que nous avons étudiées ici produisent toujours de l'acide acétique. L'acidité volatile formée est cependant très faible (inférieure à 0,20 g/litre).

— Les levures normales présentent des valeurs très variables pour l'acidité volatile (0,05 à 2 g /litre). En milieu aéré, ces souches produisent beaucoup d'acide acétique mais sont également capables de le détruire. Dans la première expérience où la fermentation n'est pas entièrement terminée l'acide acétique s'est accumulé ; dans la deuxième où la levure ne trouvait plus de sucre pour sa croissance, l'acide acétique a été respiré,

ainsi qu'un peu d'alcool. Nous verrons plus loin comment nous avons vérifié cette interprétation en suivant l'évolution de l'acidité volatile au cours de la fermentation pour les souches normales et à déficience respiratoire.

b) Étude sur jus de raisin

Nous avons repris l'étude des souches sur jus de raisin en opérant dans les mêmes conditions de culture (tableaux III et IV).

TABLEAU III

Culture agitée sur jus de raisin
(teneur en sucre du jus de raisin 212 g/litre).

Souche	Sucre résiduel	Acidité volatile	Alcool	Teneur en sucre (g/l) donnant 1° d'alcool
B	10	1	9°3	22
BP	10	0	9°7	21
BM	5	0,64	8°6	24
BMP	31	0	7°9	23

TABLEAU IV

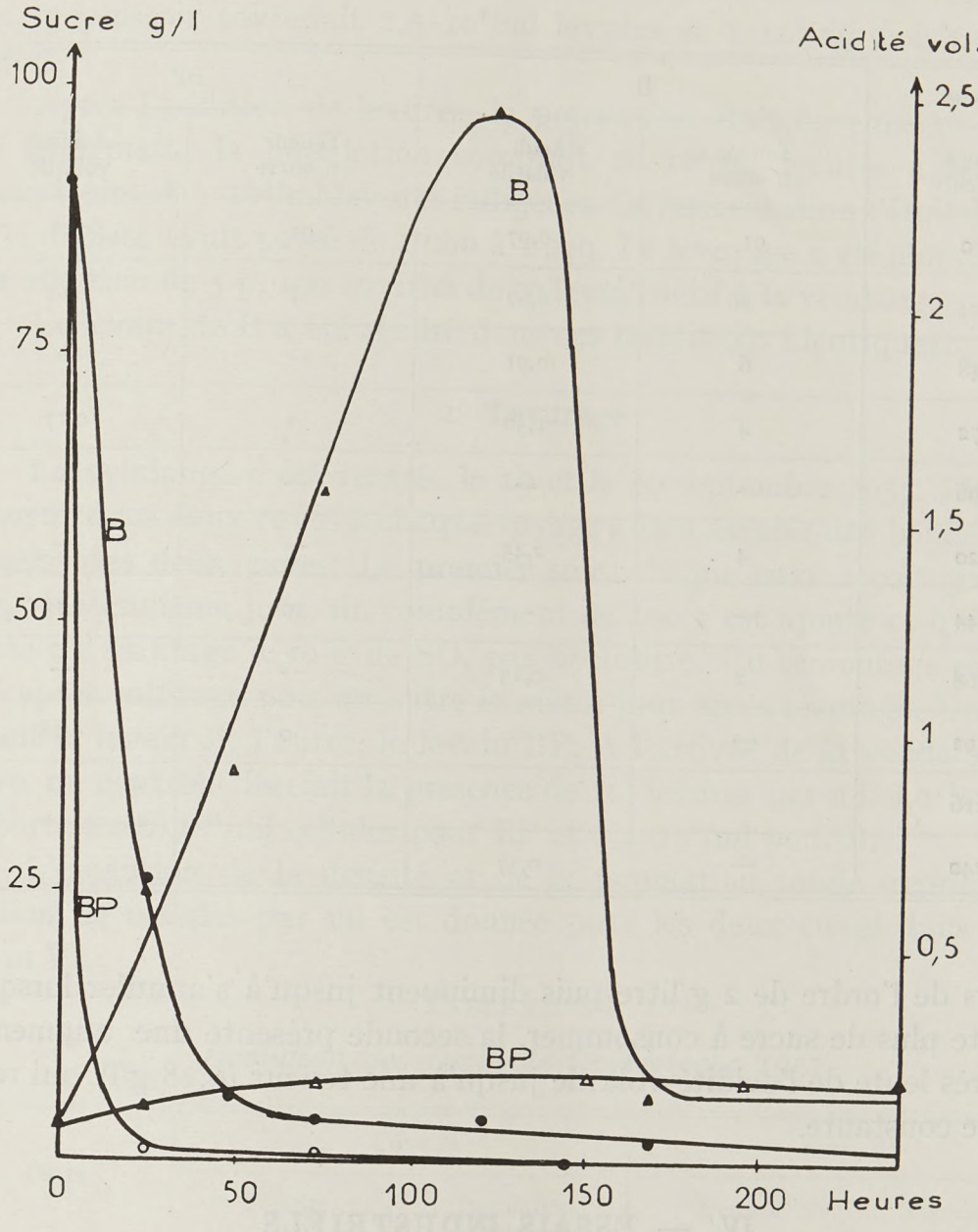
Culture agitée sur jus de raisin
(teneur en sucre du jus de raisin 198 g/l).

Souche	Sucre résiduel	Acidité volatile	Alcool	Teneur en sucre (g/l) donnant 1° d'alcool
B	7	0,63	9°70	19,5
BP	43	0,0	7°65	20
BM	8	0,51	9°45	20
BMP	71	0,0	6°90	18,5

Ces résultats confirment ceux obtenus dans les mêmes conditions d'aération sur milieu à base d'extrait de levures au point de vue de la formation d'acide acétique. Les rendements en alcool des 4 souches sont plus faibles sur jus de raisin. Sauf dans un seul cas, nous avons observé des rendements supérieurs pour les souches à déficience respiratoire que pour les souches normales.

c) Étude de la formation de l'acidité volatile

Les teneurs en acidité volatile trouvées dans les diverses expériences varient parfois pour une même souche d'une expérience à l'autre. Nous



GRAPHIQUE I

Variations de l'acidité volatile et de la teneur en sucre au cours de la fermentation.
△ Acidité volatile (exprimée en gramme d'acide sulfurique par litre)
○ Teneur eu sucre (exprimée en gramme de glucose par litre).

avons donc effectué un contrôle des variations de l'acidité volatile au cours de la fermentation par une levure normale et par une levure à déficience respiratoire en utilisant le milieu précédemment décrit (tableau V) (graphique 1).

Les comportements de la souche normale et de la souche à déficience respiratoire sont très différents. Alors que la première donne des acidités volatiles qui augmentent pendant la fermentation jusqu'à des

Tableau V

Souche	B		BP	
Temps en heure	Teneur en sucre	Acidi volatile	Teneur en sucre	Acidité volatile
0	91	0,07	91	0,07
24	26	0,62	1	0,12
48	6	0,91	—	—
72	4	1,56	1	0,17
96	—	—	—	—
120	4	2,45	—	—
144	—	—	0	0,19
168	2	0,13	—	—
192	—	—	0	0,18
216				
240	—	0,17		

valeurs de l'ordre de 2 g/litre puis diminuent jusqu'à s'annuler lorsqu'il ne reste plus de sucre à consommer, la seconde présente une augmentation très lente de l'acidité volatile jusqu'à une teneur (0,18 g/l) qui reste ensuite constante.

IV. — ESSAIS INDUSTRIELS

L'étude au laboratoire permet de comparer les caractéristiques générales de deux levures mais ne permet pas de tirer de conclusion sur leur intérêt pour l'industrie. Il n'est pratiquement pas possible d'obtenir au laboratoire des conditions qui soient à la fois reproductibles et voisines des conditions de la pratique industrielle. Nous avons donc effectué en 1957 et 1958 des essais de levurage dans la cave de l'École nationale d'Agriculture de Montpellier.

A. — Essais de levurage 1957

1° Préparation des levains

Le levain de BP a été préparé à l'aide de jus d'Aramon non sulfité auquel on a ajouté un dixième d'une culture pure de levures actives. Le jus au pressoir contenait $1{,}5 \cdot 10^4$/ml levures et $1 \cdot 10^4$/ml moisissures diverses.

Après l'addition de levures, la population était devenue $10 \cdot 10^6$/ml. Le lendemain, la population comptait $10 \cdot 10^6$/ml levures à déficience respiratoire et $3 \cdot 10^4$/ml levures indigènes. La fermentation s'était déclarée et la densité avait passé de 1 060 à 1 049. Le levurage a été alors effectué par addition de 5 p. 100 environ de ce levain actif à la vendange.

Le levain de B a été réalisé dans des conditions identiques.

2° Levurage

La vendange a été rentrée le 19 et le 20 septembre 1957. Elle était répartie dans deux cuves à chaque voyage afin d'assurer une bonne homogénéité des deux cuves. Le premier soir, chaque cuve reçoit 300 g de SO_2 ; le deuxième jour, un complément de 100 g est ajouté ce qui représente un sulfitage à 10 g de SO_2 par hectolitre. Un remontage est effectué après sulfitage puis un autre le même jour après levurage. Une cuve reçoit le levain B, l'autre, le levain BP. A l'arrivée de la vendange à la cuve, un contrôle décelait la présence de 10^4 levures par ml. Le levurage apportait $0{,}6 \cdot 10^6$/ml cellules pour BP et $1{,}4 \cdot 10^6$/ml pour B.

L'évolution de la densité et de la population totale exprimée en million de cellules par ml est donnée pour les deux cuves dans le tableau VI.

Tableau VI

Évolution des cuves de l'expérience 1957.

Dates	Cuve B		Cuve BP	
	Densité	Population totale	Densité	Population totale
20/9	1 072	1,4	1 073	0,6
21	1 072	4	1 072	0,8
22	—	—	—	—
23	1 027	130	1 056	44
24	1 005	52	1 040	52
25	—	—	1 005	52

Le contrôle du développement des levures indigènes et des levures à déficience respiratoire a été effectué sur la cuve d'expérience (tableau VII).

Un remontage avec aération a été réalisé tous les jours afin de pouvoir faire des prélèvements représentatifs bien que l'aération favorise les levures indigènes par rapport aux levures à déficience respiratoire.

TABLEAU VII

Dates	20	21	22	23	24	25
Pourcentage de levures indigènes	2 %	2 %	—	3,5 %	96 %	95 %

Ces résultats font apparaître un retard d'un jour pour la cuve levurée avec la levure à déficience respiratoire. Si cette levure domine au début de la fermentation, elle est remplacée par les levures indigènes le cinquième jour.

L'analyse des vins obtenus est donnée dans le tableau VIII.

TABLEAU VIII

Analyse des vins 1957.

	BP	B
Densité	998	998
Alcool	9°45	9°45
Acidité totale.....	7 g	7,2 g
Acidité volatile	0,26	0,20
Acidité volatile corr.	0,21	0,15
Acidité fixe	6,74	7

En fait, aucune différence n'apparaît à l'analyse entre les deux cuves.

Les deux vins se sont également révélés très voisins à l'examen organoleptique.

B. — Essais de levurage 1958

L'essai de levurage a été repris en 1958. La vinification a été effectuée en rosé, ce qui a permis d'effectuer des prélèvements au centre de la cuve sans effectuer de remontage. Ainsi, on évite les inconvénients d'une aération trop importante.

1° Préparation des levains

Le levain de BP a été préparé à l'aide de jus d'Aramon non sulfité.

Ce moût contenait à l'ensemencement $1 \cdot 10^6$ levures/ml ; il a reçu 2,5 p. 100 d'une culture pure de BP.

Le lendemain, ce levain servait au levurage d'une cuve d'expérience et contenait alors $60 \cdot 10^6$ levures/ml dont $1 \cdot 10^6$ levures indigènes.

Le levain de B préparé dans des conditions identiques contenait au moment de l'emploi $200 \cdot 10^6$ levures/ml.

2° Essais de levurage

La vendange a été rentrée le 18 et le 19 septembre 1958. Elle était reçue dans une cuve de 130 hectos et sulfitée à 10 g par hectolitre. La dose d'anhydride sulfureux nécessaire a été rajoutée en une seule fois le premier soir de la vendange. Le sulfitage a été suivi d'un remontage sans aération. Le second jour, la saignée de la cuve a permis de remplir deux petites cuves de 30 hl.

Les deux cuves ont été soigneusement homogénéisées. A la saignée la population indigène était de $2{,}5 \cdot 10^5$ levures/ml.

Après levurage, la population totale était de $6{,}7 \cdot 10^6$ pour la cuve BP et de $2{,}7 \cdot 10^6$ pour la cuve B.

L'évolution des deux cuves (densité et population totale) est donnée par le tableau IX.

Tableau IX

Évolution des cuves de l'expérience 1958.

Date	B		BP	
	densité	Population totale	Densité	Population totale
19/9/58	1068	2,7	1070	6,7
20/9	1066	23	1068	25
21	1050	—	1055	—
22	1031	50	1033	70
23	—	—	—	—
24	1005	100	1008	100
25	999	64	1001	116

Un contrôle permet de déterminer pour la cuve BP l'évolution de la population indigène et de BP (tableau X).

La multiplication de BP est lente et peu nette. Au contraire, les levures indigènes se multiplient très rapidement et représentent dès le quatrième jour, la moitié de la population.

TABLEAU X

Dates	19	20	21	22	23	24	25
Pourcentage de levures indigènes.....	0,01 %	0,01	7	44	—	55	80

L'analyse des vins (tableau XI) ne montre pas de différence au point de vue teneur en alcool. La cuve ensemencée avec la levure BP a donné une fermentation malolactique dès le début de l'hiver ; c'est ce qui explique l'acidité fixe faible et l'acidité volatile assez élevée que l'on observe.

TABLEAU XI

Analyse des vins 1958.

	BP	B
Densité	993	991
Alcool	9°85	9°8
Acidité totale.....	3,5 g	4,5 g
Acidité volatile	0,49	0,26
Acidité fixe	3,01	4,21

Les résultats de 1958 confirment donc ceux de 1957. La souche BP est incapable de se maintenir dans les conditions de la grande pratique et ne résiste pas à la sélection naturelle. Les essais devront être repris avec d'autres souches plus vigoureuses.

CONCLUSION

Les levures normales produisent une quantité importante d'acide acétique au cours de leur développement en milieu fortement aéré. Elles ont une double action : elles forment l'acide acétique et elles le détruisent par respiration. Ainsi l'acidité volatile trouvée dans les cultures est très variable car sa teneur dépend de deux paramètres : une production très élevée et une consommation variable selon les conditions de culture et de fermentation.

Par contre, les levures à déficience respiratoire produisent très peu d'acidité volatile mais ne l'utilisent pas. Les teneurs finales des cultures sont faibles (inférieures à 0,20 g/l) et beaucoup plus facilement reproductibles que celles des cultures de levures normales.

En milieu fortement aéré, le rendement en alcool des petites colonies est nettement supérieur à celui des « grandes ». La différence est moins nette sur jus de raisin que sur milieu à base d'extrait de levures. Seuls des bilans nombreux au stade industriel peuvent permettre de se rendre compte du gain d'alcool que l'on peut espérer obtenir.

La levure BP n'a pas une vitalité suffisante pour résister à la sélection naturelle en vinification. Son emploi dans d'autres industries (brasserie, distillerie) est certainement possible. Cependant il n'est pas impossible d'accroître la vitalité de cette souche ou d'en trouver d'autres plus actives dont l'emploi pourrait être réalisé avec succès en vinification. Il serait particulièrement intéressant à cet égard de rechercher un mutant de BP résistant à l'anhydride sulfureux.

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

(1) Ephrussi (B.), Hottinguer (H.) et Chimenes (A. M.). — Action de l'acriflavine sur les levures. I. — La mutation petite colonie. *Ann. Inst. Past.*, **76**, 351, 1949.

(2) Tavlitzki (J.). — Action de l'acriflavine sur les levures. III. — Étude de la croissance des mutants « petite colonie. *Ann. Inst. Past.*, **76**,-497, 1949.

(3) Slonimski (P. P.). — Action de l'acriflavine sur les levures. IV. — Mode d'utilisation du glucose par les mutants « petite colonie ». *Ann. Inst. Past.*, **76**, p. 510, 1949.

(4) Slonimski (P. P.) et Ephrussi (B.). — Action de l'acriflavine sur les levures. V. — Le système des cytochromes des mutants petites colonies. *Ann. Inst. Past.*, **77**, p. 47, 1949.

(5) Slonimski (P. P.). — Action de l'acriflavine sur les levures. VII. — Sur l'activité catalytique du cytrochrome *c* des mutants « petite colonie » de la levure. *Ann. Inst. Past.*, **77**, p. 774, 1949.

(6) Slonimski (P. P.). — *La formation des enzymes respiratoires chez la levure.* Masson Éd.

(7) Ephrussi (B.), Hottinguer (H.) et Tavlitzki (J.). — Action de l'acriflavine sur les levures. II. — Étude génétique du mutant « petite colonie ». *Ann. Inst. Past.*, **76**, p. 419,1949.

(8) Ephrussi (B.) Chen (S.) et Hottinguer (H.). — Nature génétique des mutants à déficience respiratoire de la souche B. II — de la levure de boulangerie. *Heredity*, **4**, 337, 1950.

(9) Ephrussi (B.), L'Héritier (Ph.) et Hottinguer (H.). — Action de l'acriflavine sur les levures. IV. — Analyse quantitative de la tranformation des populations. *Ann. Inst. Past.*, **77**, p. 64, 1949.

(10) Marcovich (H.). — Influence du pH sur l'action toxique et mutagène de l'acriflavine sur les levures. *Ann. Inst. Past.*, **85**, p. 443 1953.

(11) Slonimski (P. P.). — Respiration and the growth of yeast. *Society of chemical industry*, n° 3, p. 7-20, 1959.

(12) VENTRE (J.). — Les levures en vinification. *Annales des fermentations*, p. 301, 1937.
(13) GALZY (P.) et DUPUY (P.). — Perspectives d'utilisation d'une levure mutante à la canavanine pour le contrôle du levurage. *Ann. Technol.*, **2**, p. 235, 1957.
(14) FLANZY (M.), BOUZIGUES (Mme L.) et BOUZIGUES (H.). — La détermination chimique du degré alcoolique du vin, par le mélange sulfochromique. *Ann. Techn. Agr.*, **4**, p. 397, 1955.
(15) JOLIVET (R.). — Contribution à l'étude des fermentations. Analyse chromatographique des acides gras volatils. *Ann. Inst. Agr. d'Algérie*, T. **X**., 1957, fascicule 6.

Le Directeur-Gérant : B. LACLAVIÈRE.

L'INHIBITION PAR L'ACIDE SULFUREUX DE L'OXYDATION DE L'ETHANOL PAR ACETOBACTER RANCENS

PAR

P. DUPUY

Station de Technologie végétale, Versailles.

(Suite).

CHAPITRE IV

FIXATION DE L'ACIDE SULFUREUX SUR LES BACTÉRIES

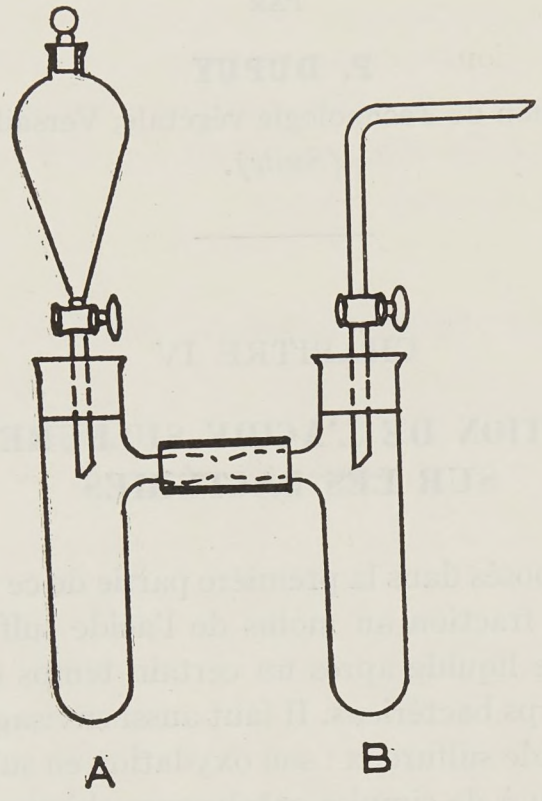
Les résultats exposés dans la première partie de ce travail permettent de supposer, qu'une fraction au moins de l'acide sulfureux que l'on ne retrouve plus dans le liquide après un certain temps d'incubation, peut s'être fixée sur les corps bactériens. Il faut aussi envisager une autre cause de disparition de l'acide sulfureux : son oxydation en sulfate, qui peut être due à des enzymes ou à de simples catalyseurs chimiques. Pour départager l'importance de ces deux phénomènes, il aurait été nécessaire de faire un bilan du soufre, or le dosage des faibles quantités de sulfate en présence de sulfite et de concentrations importantes en phosphate, a présenté des difficultés insurmontables. La microméthode de DOGSON et SPENCER (22) qui consiste à former un précipité de sulfate de benzidine, que l'on détermine par colorimétrie en présence de thymol et d'acide nitreux, bien que très sensible, n'a pas donné de bons résultats.

Il faut donc s'adresser à une technique permettant de doser directement la quantité d'acide sulfureux fixé sur les corps bactériens. L'emploi d'acide sulfureux radioactif a permis de déceler avec facilité de très faibles quantités et s'est montré bien approprié à ce genre d'étude. On peut alors mesurer directement la radioactivité et non plus calculer l'incorporation du sulfite par différence. On augmente ainsi considérablement la précision des résultats.

I. — Techniques.

a) Purification du sulfite radioactif.

On a utilisé comme marqueur une solution de sulfite de sodium 35 S livrée par le Commissariat à l'Énergie Atomique. La solution avait déjà commencé à s'oxyder et contenait une partie de sa radioactivité sous forme de sulfate. Aussi avons-nous préféré la purifier avant l'emploi.



Graphique 10. — Appareil utilisé pour la purification du sulfite radioactif.

Le montage représenté sur le graphique 10 a été utilisé. La solution radioactive, soit 10 ml contenant 4 m mol. de sulfite, est introduite dans le tube A et on place dans le tube B, 4 ml de soude 2 N qui suffisent à fixer sous forme de sulfite neutre, tout l'anhydride sulfureux dégagé. Le contenu du tube A est congelé avec un mélange glace carbonique-alcool; on fait alors le vide dans l'appareil, on laisse réchauffer lentement et lorsque le produit est redevenu liquide on introduit au moyen d'une ampoule à brome 4 à 5 ml d'acide sulfurique 6 N. Après 16 heures, on recueille dans le tube B une solution de sulfite qui a été soumise à l'analyse. Le titre mesuré par iodométrie était de 0,172 M et la radioactivité de 1,3 m curie/ml, soit une radioactivité spécifique de 7,5 mc/m mol.

b) Mesure de la radioactivité.

Le 35 S émet un seul rayonnement d'électrons négatifs de faible énergie : 0,167 MeV. Sa détection a été faite avec un compteur de Geiger-Muller GEC à fenêtre de mica, de 1,9 mg/cm², couplé à une échelle de comptage E C G 3 de la Société d'Applications Industrielles de la Physique. Le voltage de travail a été réglé à 1 450 V. Dans ces conditions, on a vérifié avec un étalon que 1 microcurie correspond à 2 420 coups/seconde.

Les échantillons constitués par des liquides ou des suspensions bactériennes sont étalés sur des plaques d'aluminium dégraissées. Pour éviter les pertes de sulfite par volatilisation, qui peuvent se produire lorsqu'on travaille avec des solutions acides de sulfite, on introduit la prise d'essai dans une goutte de soude 0,1 N. La préparation est étalée dans un cercle de 2 cm de diamètre et séchée à l'air chaud. Pour chaque mesure, on prépare au moins 2 plaques identiques. La correction d'absorption propre est inutile, puisque les échantillons comptés, même ceux qui contiennent des bactéries, ont toujours moins de 0,5 mg de matière sèche ; dans ces conditions, la correction est inférieure à 1 p. 100, elle est donc négligeable devant les autres causes d'erreur.

II. — Fixation de l'acide sulfureux sur les bactéries.

L'expérience qui met en évidence cette fixation, consiste à mettre en incubation les bactéries en présence de sulfite radioactif et à déterminer la radioactivité qui se trouve liée aux corps bactériens. Le mode opératoire utilisé est le suivant. Dans des tubes à centrifuger coniques de 10 ml, on ajoute dans l'ordre indiqué : 1 ml de suspension qui contient environ 5 mg de bactéries (poids sec), 1 ml de tampon McIlvaine au pH désiré et 0,1 ml d'une solution de sulfite de sodium 0,02 M contenant comme marqueur 5 p. 1 000 en volume de la solution de sulfite radioactif qui a été obtenue après purification. Les tubes sont bouchés au caoutchouc et maintenus à 0° pendant la période d'incubation. On centrifuge ensuite 5 minutes à 3 500 g. La radioactivité du liquide surnageant est déterminée sur une partie aliquote, habituellement 20 µl. Il est indispensable, lorsqu'on travaille en milieu acide avec l'acide sulfureux radioactif, de boucher les tubes aussitôt que le produit est introduit pour éviter les risques de contamination radioactive.

Les bactéries formant un culot compact au fond du tube, il est possible de verser le liquide et de nettoyer les parois, afin d'éliminer le maximum de liquide radioactif. La méthode adoptée est inspirée de celle utilisée par Dogson et Spencer (22) pour le nettoyage des tubes contenant de très petits précipités de sulfate de benzidine. On commence à essuyer l'intérieur du tube avec un tampon de papier filtre, serré dans une

pince. Ensuite, avec une pipette recourbée, on rince les parois intérieures du tube maintenu vertical, puis on essuie à nouveau. Le culot peut alors être repris dans une quantité connue de soude 0,05 N, en général 250 µl. Les bactéries forment une suspension visqueuse, dont on prélève une partie aliquote, en général 20 µl., pour déterminer la radioactivité fixée.

Il est indispensable de corriger cette mesure, car le culot bactérien contient encore une quantité non négligeable de liquide radioactif, qui se dilue lorsqu'on le reprend dans la soude. D'autre part, il change le volume final dans lequel se trouvent les bactéries. Il est possible de déterminer la quantité d'eau ainsi retenue en faisant la différence de pesée du tube,

TABLEAU XXIV

Fixation du sulfite radioactif sur les bactéries à deux pH différents.

Durée de l'incubation	Radioactivité en c/s		
	dans le surnageant	dans les bactéries	% de SO_2 fixé par les bactéries
A pH 6,8			
5 mn.	1680	4,75	0,28
45	1680	5	0,30
180	1680	0	0
A pH 3,8			
5 mn.	1590	64	3,85
45	1590	64,7	2,90
180	1590	42,7	2,56

Bactéries 1,56 mg/ml mises en incubation à 0° dans du tampon Mc Ilvaine, pH 3,8, concentration en $PO_4 \equiv$ 0,036 M ou pH 6,8 concentration en $PO_4 \equiv$ 0,0081 M. Sulfite 0,48 µ mol/ml. Chaque expérience est effectuée sur une prise d'essai de 2 ml et les résultats exprimés pour ce volume.

culot humide et après séchage à 105°. Cette mesure a été faite sur 4 essais différents et a donné des chiffres assez voisins, à savoir : 30,5 ; 29,2 ; 28,1 ; 27,5 mg d'eau. Dans toutes nos expériences, cette double correction a été faite en estimant à 30 mg le poids d'eau contenue dans les bactéries. Lorsqu'elles sont reprises dans 250 µl et que les déterminations sont faites sur 20 µl, la radioactivité totale est calculée de la façon suivante :

Soit *a*, la radioactivité dans 20 µl de liquide surnageant et *b*, la radioactivité dans 20 µl des bactéries remises en suspension, la radioactivité totale fixée est :

$$\frac{b \times (250 + 30)}{20} - \frac{a \times 30}{20}.$$

Cette correction est approchée par excès, puisqu'elle ne tient pas compte d'une partie de l'eau qui est intracellulaire. En toute rigueur il ne faudrait retrancher que la radioactivité du liquide qui entoure les corps

microbiens. Nous pensons cependant que la précision de la méthode n'aurait pas été améliorée par cette correction plus parfaite.

Le tableau XXIV donne la description et les résultats d'une telle expérience réalisée à deux pH différents. La radioactivité incorporée dans les bactéries du culot a été suivie en fonction de la durée d'incubation. Les résultats indiquent la radioactivité du liquide surnageant exprimée en coups/s et la radioactivité fixée sur les bactéries exprimée dans les mêmes unités. Le rapport de ces deux valeurs permet de déterminer le pourcentage de sulfite qui s'est fixé sur les bactéries.

Ces premiers résultats démontrent que la technique choisie convient pour mettre en évidence et étudier la fixation de l'acide sulfureux sur les bactéries. Il apparaît alors que la fixation très faible en milieu neutre devient environ 15 fois plus forte lorsque le pH s'abaisse à 3,8. Le temps d'incubation influe sur la quantité d'acide sulfureux fixé, de même qu'il influe sur le degré d'inhibition, ainsi qu'on l'a déjà démontré (p. 274). Une expérience analogue a été refaite en choisissant 20° comme température d'incubation ; elle est décrite dans le tableau XXV.

TABLEAU XXV

Fixation du sulfite radioactif sur les bactéries en fonction du temps.

Durée de l'incubation	SO_2 en coup/sec		% SO_2 fixé sur les bactéries
	dans le surnageant	dans les bactéries	
5 mn.	5280	435	7,6
30 mn.	5250	371	6,6
140 mn.	5200	138	2,6
260 mn.	5130	63,7	1,2

Bactéries 3,3 mg/ml mises en incubation à 20° dans du tampon Mc Ilvaine pH 3,8 concentration en PO_4 ≡ 0,036 M. Sulfite 0,48 µ mol./ml. Chaque expérience est effectuée sur une prise d'essai de 2 ml et les résultats exprimés pour ce volume.

Dans les deux expériences, on remarque que le maximum de sulfite fixé est rapidement obtenu, que l'on opère à 0° ou à 20°. Mais à 20° il diminue plus rapidement qu'à 0°. C'est cette raison qui nous a déterminé à choisir la température de 0° pour faire nos essais et à faire une incubation comprise entre 5 et 45 minutes (en général 30 minutes), puisque dans ces conditions la quantité d'acide sulfureux combiné reste à peu près constante. On remarque dans ces essais une particularité que nous n'avons pu expliquer : c'est la disparition du sulfite fixé sur les bactéries lorsqu'on prolonge l'incubation.

a) **Cas des bactéries traitées à l'iode ou inactivées par chauffage.**

Afin de voir si la fixation de l'acide sulfureux sur les bactéries présente une signification biologique, nous avons recherché s'il existe sur ce point des différences entre les bactéries vivantes et les bactéries mortes ou modifiées par certains traitements.

Les réactifs les plus intéressants nous ont paru ceux susceptibles de modifier les groupements sulfhydryles, dont l'importance est en général primordiale pour l'activité enzymatique. On peut penser que l'iode, susceptible d'oxyder les groupements sulfhydryles en disulfures en milieu neutre, doit aussi modifier la fixation de l'acide sulfureux. Cette technique a déjà été utilisée par de nombreux auteurs pour l'étude des protéines enzymatiques (3) (27). Au cours d'essais préliminaires, on a remarqué que l'iode était absorbée en grande quantité sur les corps bactériens. Il était donc nécessaire de l'éliminer, dans la mesure du possible, afin que l'acide sulfureux ne puisse pas réagir sur l'iode ainsi absorbée, ce qui empêcherait de déceler celui qui serait susceptible de réagir avec les groupes sulfhydryles libres. Le lavage à l'eau ne s'étant pas montré efficace, l'iode absorbée a dû être éliminée par lavage des bactéries avec de l'hyposulfite 0,001 N. Sur ce principe on a effectué l'expérience décrite dans le tableau XXVI.

TABLEAU XXVI

Influence d'un traitement à l'iode sur la fixation du sulfite radioactif.

	Radioactivité en c/s		% de SO_2 fixé sur les bactéries
	dans le surnageant	dans les bactéries	
A pH 3 :			
Bactéries témoin ⊕	1242	108,7	8,05
Bactéries traitées à l'iode + ...	1265	37,8	2,90
A pH 6,8 :			
Bactéries témoins ⊕	1282	3,28	0,26
Bactéries traitées à l'iode + ...	1248	25,9	2,04

Bactéries 4 mg/ml mises en incubation 10 minutes à 0° dans du tampon Mc Ilvaine, pH 3 concentration en phosphate 0,02 M. Sulfite 0,48 μ mol/ml. Chaque expérience est effectuée sur une prise d'essai de 2 ml et les résultats exprimés pour ce volume.
\+ Bactéries traitées dans les conditions suivantes. Bactéries 4,7 mg/ml mises en incubation 15 minutes à 0° dans du tampon Mc Ilvaine, pH 6,8, concentration en $PO_4 \equiv$ 0,081 M. Iode 0,028 N. Centrifugé. Lavé dans la quantité nécessaire d'hyposulfite 0,001 N. jusqu'à décoloration des bactéries. Repris dans l'eau.
⊕ Même traitement sauf l'addition d'iode.

La fixation d'acide sulfureux radioactif a été comparée sur des bactéries traitées et non traitées à l'iode, à pH 6,8 et pH 3. Les résultats montrent que les bactéries traitées à l'iode fixent l'acide sulfureux dans des proportions et des conditions bien différentes des bactéries témoins. En

particulier, lorsqu'on passe de pH 6,8 à pH 3, la quantité d'acide sulfureux fixée augmente de 33 fois pour les bactéries témoins, alors qu'elle augmente de 1,4 fois pour les bactéries ayant subi le traitement à l'iode. Le fait que ces dernières présentent une absorption importante d'acide sulfureux, même en milieu neutre, n'a rien de surprenant, car on peut admettre que le traitement ménagé à l'hyposulfite n'a pas suffi à faire entièrement disparaître l'excès d'iode de l'intérieur ou de la surface des corps bactériens. Un résultat assez analogue est obtenu lorsque les bactéries sont inactivées par chauffage.

L'expérience est décrite dans le tableau XXVII qui compare la fixation de l'acide sulfureux sur des bactéries fraîches et des bactéries bouillies et cela à trois pH différents. Ici aussi les bactéries mortes fixent beaucoup moins d'acide sulfureux que les bactéries actives.

TABLEAU XXVII

Fixation du sulfite radioactif par les bactéries inactivées par la chaleur.

	Bactéries actives			Bactéries chauffées 5 mn à 100°		
	Radioactivité en c/s			Radioactivité en c/s		
pH	dans le surnageant	dans les bactéries	% de So_2 fixé	dans le surnageant	dans les bactéries	% de So_2 fixé
3	1054	130	12,3	1064	20,6	1,94
4,8	1162	51,2	4,4	1196	0	0,0
6,8	1162	10,9	0,94	1212	1,2	0,1

Bactéries 6 mg/ml mises en incubation 10 minutes à 0° dans du tampon Mc Ilvaine pH 3, concentration en $PO_4 \equiv 0{,}02$ M, pH 4,8 concentration en $PO_4 \equiv 0{,}05$ M. pH 6,8, concentration du $PO_4 \equiv 0{,}08$ M. Sulfite 0,5 µ mol/ml. Chaque expérience est effectuée sur une prise d'essai de 2 ml et les résultats exprimés pour ce volume.

b) Variation de l'acide sulfureux fixé en fonction du pH.

Les expériences que nous avons déjà rapportées montrent que la fixation du sulfite varie beaucoup avec le pH. En vue de rechercher la relation qui peut exister entre ces deux variables, nous avons mesuré la fixation dans un même système tampon, à des pH allant de 2,6 à 6,8. Le pH 2,6 peut paraître extrêmement bas mais nous avons montré qu'il n'est pas dépourvu de signification biologique (voir p. 265).

Les résultats rapportés dans le tableau XXVIII indiquent comment se comporte une même quantité de bactéries mise en présence de la même concentration de sulfite à des pH différents. On constate facilement que le pourcentage de sulfite fixé augmente d'une façon continue lorsque le pH diminue.

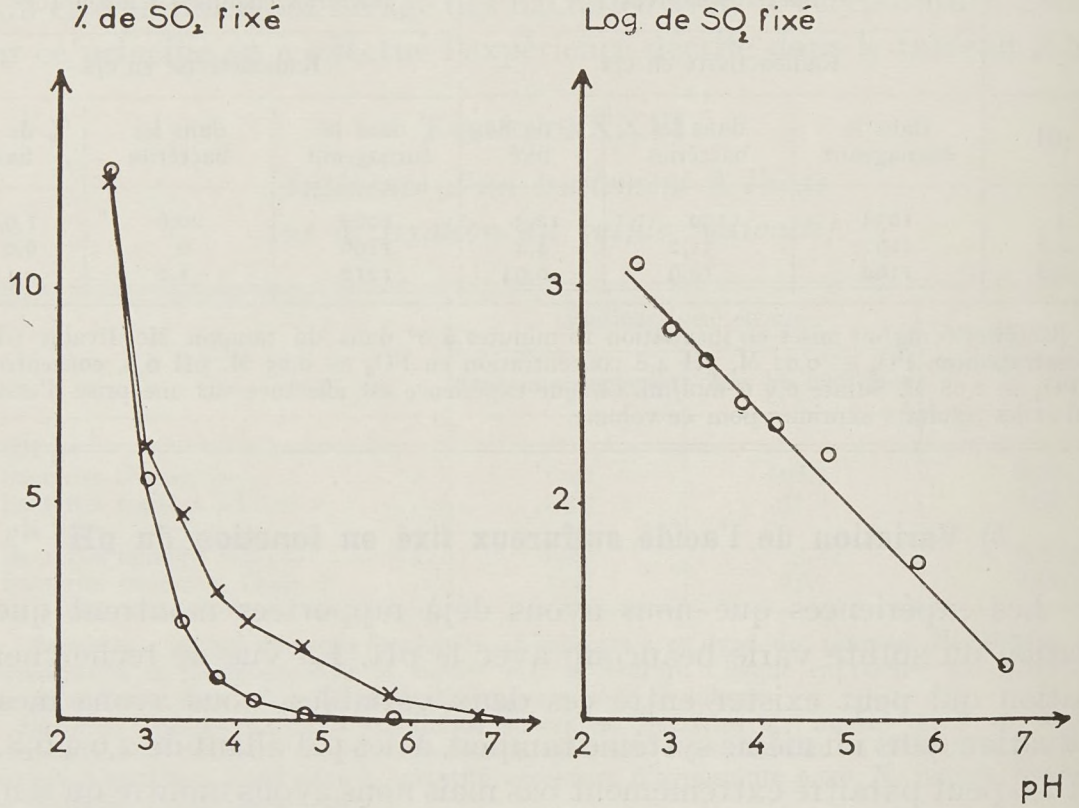
Le graphique 11 a été fait en vue d'expliciter la relation qui existe entre ces deux variables. Si l'on représente le logarithme de la quantité de sulfite fixé en fonction du pH, les points sont assez bien alignés pour

TABLEAU XXVIII

Fixation du sulfite radioactif en fonction du pH.

pH	Radioactivité c/s			% de SO_2 fixé	% de SO_2 sous la forme SO_3H_2
	dans le surnageant	dans les bactéries	total		
6,8	1913	3,36	1916	0,175	0,00066
5,8	1995	10,55	2005	0,52	0,0088
4,8	1840	30,3	1870	1,62	0,091
4,2	1800	42,4	1840	2,30	0,36
3,8	1810	54	1864	2,90	0,91
3,4	1638	79,5	1718	4,63	2,26
3	1617	109	1726	6,33	5,49
2,6	1428	206	1634	12,6	12,75

Bactéries 2,8 mg/ml mises en incubation 10 minutes à 0° dans du tampon Mc Ilvaine. Sulfite 0,5 µ mol/ml. Chaque expérience est effectuée sur une prise d'essai de 2 ml et les résultats exprimés pour ce volume. Pour le calcul de la forme SO_3H_2 voir page, 277.



GRAPHIQUE 11. — Représentation graphique des données du tableau XXVII.
(X) % de SO_2 sous la forme SO_3H_2.
(O) % de SO_2 fixé sur les bactéries.

qu'on puisse admettre qu'il existe une relation linéaire entre les deux valeurs. Il nous a paru intéressant de savoir si la fixation de l'acide sulfureux est le fait des molécules non dissociées ou des ions. C'est dans cette

intention qu'a été construit le graphique qui compare pour chaque pH, le pourcentage de sulfite fixé, au pourcentage de la forme moléculaire. Aux pH 3-2,6 tout se passe comme si tout l'acide sulfureux non ionisé se fixait sur les bactéries. Entre pH 7 et pH 3, le pourcentage d'acide sulfureux fixé est supérieur à celui qui peut être présent sous forme non ionisée, il faut donc admettre que des ions SO_3H^- se fixent aussi. Au-dessus de pH 7 la fixation est à peu près nulle, ce qui indique que les ions $SO_3^=$ ne peuvent se fixer sur les bactéries.

c) Variation de l'acide sulfureux fixé en fonction de la concentration.

La combinaison de l'acide sulfureux avec les bactéries est une réaction réversible et limitée, comme la formation des autres combinaisons bisulfitiques. La réversibilité apparaît dans l'expérience, où l'on a lavé les bactéries traitées par l'acide sulfureux. L'existence d'un équilibre se déduit du fait que la combinaison n'est jamais complète. Afin de chercher à préciser quantitativement cet état d'équilibre, on a déterminé l'acide sulfureux fixé sur la même quantité de bactéries en fonction de sa concentration. L'expérience a été répétée à deux pH différents. Les résultats sont contenus dans le tableau XXIX.

TABLEAU XXIX

Fixation du sulfite radioactif en fonction de sa concentration.

	SO_2 en µ mol/l	Radioactivité en c/s			
		dans le surnageant	dans les bactéries	% de SO_2 fixé	µ mol/l de SO_2 fixé
pH 3	7600	1216	94,6	7,20	547
	3800	1250	54,0	4,14	157
	1900	1292	45,6	3,40	65
	950	1330	28,8	2,10	20
pH 3,8	7600	1415	49,8	3,40	258
	3800	1415	42,0	2,88	109
	1900	1416	17,3	1,20	22,8
	950	1430	9,4	0,65	6,2

Bactéries 2 mg/ml mises en incubation 10 minutes à 0° dans du tampon Mc Ilvaine, pH 3 concentration en $PO_4^{\equiv}$ 0,02 M et pH 3,8, concentration en $PO_4^{\equiv}$ 0,034 M. Chaque expérience est réalisée sur une prise d'essai de 2 ml et les résultats exprimés pour ce volume.

On a cherché à interpréter ces résultats en admettant qu'il existe sur les bactéries une seule fonction chimique susceptible de se combiner à l'acide sulfureux. La réaction peut être schématisée par la formule suivante

$$SO_2 + \text{bactéries} \rightleftarrows SO_2 \text{ bactéries}$$

et l'équilibre est atteint lorsque

$$\frac{(SO_2)\,[(\text{bactéries}) - (SO_2\ \text{bactéries})]}{(SO_2\ \text{bactéries})} = K$$

où (SO_2) et $(SO_2$ bactéries) sont connus par les mesures de radioactivité. La seule inconnue pour pouvoir calculer K est la concentration en l'hypothétique fonction chimique présente sur les bactéries. Lorsqu'on réalise plusieurs expériences qui contiennent au départ la même quantité de bactéries, il est possible d'éliminer la valeur (bactéries) entre deux équations et de déterminer K. On a effectué ce calcul avec les données du tableau XXIX et il a conduit à des valeurs négatives de K, ce qui est absurde et indique que notre hypothèse de départ n'est pas vérifiée.

Il est plus vraisemblable que l'acide sulfureux puisse réagir sur plusieurs fonctions chimiques A, B... N présentes sur les bactéries. On obtient alors la série d'équilibre suivante :

$$\frac{(SO_2)[(A) - (SO_2A)]}{(SO_2A)} = K_A$$

$$\frac{(SO_2)[(B) - (SO_2B)]}{(SO_2B)} = K_B$$

et la relation $(SO_2A) + (SO_2B) + \ldots (SO_2N) = SO_2$ combiné aux bactéries. En combinant ces trois équations on obtient :

$$(SO_2\ \text{bactéries}) = (SO_2)\frac{(A)}{K_A + (SO_2)} + \frac{(B)}{K_B + (SO_2)} + \cdots \frac{(N)}{K_N + (SO_2)}$$

qu'il est impossible de résoudre tant qu'on ne connaît pas K_A, K_B... K_N. On est en présence d'un équilibre trop complexe pour être défini par une seule constante. Une difficulté analogue a été rencontrée par Ingram et Vas (43), lorsqu'ils ont essayé de trouver la relation qui existe entre l'acide sulfureux libre et l'acide sulfureux combiné dans les jus d'oranges. Nous sommes donc amenés à admettre, comme ces auteurs, que plusieurs composés chimiques participent à la fixation de l'acide sulfureux.

d) **Recherche de la fixation du sulfate.**

Pour notre étude de l'inhibition par l'acide sulfureux, il était important de rechercher si son accumulation dans les bactéries était un phénomène spécifique ou s'il se retrouvait lorsque les bactéries étaient mises en présence d'autres acides, Deux expériences parallèles, en milieu neutre et acide, ont été conduites l'une avec du sulfite, l'autre avec du sulfate radioactifs. Le sulfate radioactif provenait aussi d'une livraison du Commissariat à l'Énergie Atomique.

Les résultats du tableau XXX montrent que la quantité de sulfate radioactif retrouvée sur les corps bactériens est très faible et tout à fait indépendante du pH. On voit donc que l'acide sulfureux se comporte

TABLEAU XXX

Fixation comparée du sulfate et du sulfite radioactifs.

Produit radioactif utilisé	Expérience à pH 6,8			Expérience à pH 3,8		
	Radioactivité en c/s			Radioactivité en c/s		
	dans le surnageant	dans les bactéries	% fixé	dans le surnageant	dans les bactéries	% fixé
Sulfite	3673	0	0	3697	88	2,3
Sulfate	533	2,3	0,43	554	2,45	0,44

Bactéries 1,8 mg/ml mises en incubation 10 minutes à 0° dans du tampon Mc Ilvaine, pH 3,8, concentration en $PO_4 \equiv$ 0,036 M. Sulfite ou sulfate 0,5 µ mol/ml. Chaque expérience est effectuée sur une prise d'essai de 2 ml et les résultats exprimés pour ce volume.

d'une façon différente de l'acide sulfurique. Son accumulation n'est pas uniquement explicable par une différence de perméabilité des membranes microbiennes en milieu neutre et en milieu acide. L'existence d'une liaison de l'acide sulfureux par absorption sur les colloïdes ne permet pas non plus d'expliquer pourquoi l'acide sulfureux se fixe et non pas l'acide sulfurique. Par contre, les résultats s'expliquent si l'on admet une combinaison chimique véritable entre l'acide sulfureux et certaines fonctions chimiques présentes dans les cellules.

III. — Réversibilité de la fixation de l'acide sulfureux.

Des expériences déjà décrites ont montré que l'inhibition par l'acide sulfureux pouvait être levée presque totalement par un simple lavage des bactéries (voir page 278). Il était intéressant de rechercher si l'acide

TABLEAU XXXI

Élimination par lavage du SO_2 fixé.

Radioactivité en c/s.	Expérience n° 1	Expérience n° 2
Dans le surnageant	1376	1376
Dans les bactéries	137,5	145,2
Dans les bactéries après lavage (1)	19,6	22,7

Bactéries 2,7 mg/ml. mises en incubation 10 minutes à 0° dans du tampon Mc Ilvaine, pH 3, concentration en $PO_4 \equiv$ 0,02 M. Sulfite 0,5 µ mol./ml. Chaque expérience est effectuée sur une prise d'essai de 2 ml et les résultats exprimés pour ce volume.

(1) Lavage par remise en suspension des bactéries dans 2 ml du même tampon.

fixé pouvait être éliminé au moins partiellement par le même procédé.

Le tableau XXXI précise les conditions dans lesquelles l'expérience a été faite. Les résultats indiquent que 85 p. 100 de l'acide sulfureux fixé ont disparu après un simple lavage, dans une quantité minime de tampon. Il est intéressant de rapprocher ce résultat de celui obtenu lorsqu'on a étudié la réversibilité de l'inhibition par le sulfite. On a trouvé en effet, qu'il est possible de restaurer par un lavage 85 à 89 p. 100 de l'activité des bactéries inhibées.

Discussion des résultats

L'utilisation de molécules radioactives a déjà rendu des services dans l'étude des inhibitions. C'est ainsi que des expériences utilisant la radiopenicilline (18) ont permis de s'apercevoir, qu'il existe sur les bactéries des points de fixation de cet antibiotique.

En employant du sulfite radioactif, nous avons pu montrer que cet inhibiteur se fixe sur les corps bactériens et qu'il existe de grandes analogies entre cette fixation et l'action inhibitrice qui a déjà été mise en évidence.

La réversibilité a été démontrée dans les deux cas, où l'on a restauré par simple lavage 85 p. 100 de l'activité et libéré 85 p. 100 de l'acide sulfureux fixé.

Lorsqu'on considère l'influence du pH sur ces deux réactions, on constate aussi une action parallèle. Une diminution de pH augmente à la fois l'inhibition et la quantité d'acide sulfureux fixé par les corps bactériens. Jusqu'ici, l'action du pH n'a été étudiée que sur l'action bactéricide de l'acide sulfureux. Des différences considérables ont été observées pour de faibles changements de pH. Cruess et Irish (20) ont pensé que les propriétés antiseptiques des sulfites ne doivent être dues qu'à la forme moléculaire, aux ions bisulfites et à l'anhydride, et que les ions SO_3^- en sont dépourvus. Rahn et Conn (69) ont signalé une sensibilité différente chez les deux microorganismes qu'ils ont étudiés : *Escherishia coli* et *Saccharomyces cerevisiae*. La multiplication d'*E. coli* est déjà inhibée par les ions SO_3H^-, alors que celle des levures n'est sensible qu'à la forme SO_2H_3 non dissociée. Pour les levures, l'inhibition de la croissance se produit dans la zone pH 2,4 à 5 lorsque la concentration en forme non dissociée SO_2H_3 est de 4 mg/l.

Lorsqu'on se rapporte au tableau XVII, on constate que pour des pH compris entre 3 et 3,8 le taux d'inhibition de 50 p. 100 est atteint lorsque le milieu contient entre 4,4 et 5,2 μ mol/l de SO_3H_2. Les concentrations en ions bisulfites, qui varient beaucoup dans ces limites de pH, ne paraissent pas avoir une influence sur l'inhibition. Or on voit d'après le graphique 11, qu'aux environs de pH 3, la fixation de sulfite radioactif est à peu près proportionnelle à la concentration en molécules non dis-

sociées. Au contraire, à pH 4,2, les ions bisulfites doivent contribuer à l'inhibition puisqu'on n'a plus que 2,76 µ mol/l de SO_3H_2. A ce pH la combinaison du sulfite avec les bactéries doit aussi faire intervenir les ions bisulfites. Il y a donc une grande analogie de comportement en fonction du pH, dans ces deux phénomènes. Il est important de souligner que pour une même concentration en acide sulfureux, la quantité fixée augmente de la même façon que le fait l'inhibition, lorsque le pH diminue. Ce fait nouveau nous permet déjà d'éliminer une explication du pouvoir inhibiteur qui reposait sur les propriétés réductrices des sulfites. Wyss (92) se référant à l'action des sulfites sur l'insuline et en particulier aux travaux de Du Vigneaud (62), propose l'explication suivante. Les protéines enzymatiques nécessiteraient la présence de certaines liaisons disulfures pour pouvoir fonctionner. Les sulfites ainsi que d'autres réducteurs, tels que l'hydrogène sulfuré, la cystéine, le glutathion, seraient capables de couper les liaisons disulfures en faisant apparaître des groupements thiols et produiraient ainsi l'inactivation. Cette façon de voir est en contradiction avec ce qu'on a constaté concernant l'influence du pH sur l'inhibition, la fixation de l'acide sulfureux et la réversibilité de la combinaison. Il est, en effet, établi par les travaux que nous avons déjà analysés, que les réactions de Clarke ont leur optimum autour de la neutralité.D'autrepart, elles ne sont réversibles qu'en milieu neutre ou alcalin.

L'étude de l'équilibre existant entre l'acide sulfureux et les bactéries laisse prévoir qu'on ne trouvera pas une bonne corrélation entre l'inhibition et l'une des formes de l'acide sulfureux. En effet, la combinaison de l'acide sulfureux sur les corps bactériens ne correspond vraisemblablement pas à une réaction chimique simple, puisqu'on n'a pas pu déterminer une constante d'équilibre. A côté de sa réaction sur le système enzymatique, il doit aussi se produire d'autres réactions qui ne concourent en rien à l'inhibition. Ces réactions parasites sont peu importantes lorsque la concentration en acide sulfureux reste faible puisqu'on a trouvé une bonne relation entre le sulfite à introduire et l'activité à inhiber. En revanche pour les fortes inhibitions et les pH élevés cette corrélation est moins nette, car ces réactions accessoires deviennent de plus en plus importantes.

CHAPITRE V

LA COMBINAISON DE L'ACIDE SULFUREUX AVEC LA CYSTÉINE

La fixation d'acide sulfureux sur les bactéries et l'inhibition qui lui est liée, doivent faire intervenir une réaction facilement réversible qui est d'autant plus complète que le pH est plus bas. C'est un modèle pour une telle réaction qui est décrit dans la troisième partie de ce travail.

Cette étude a eu pour point de départ, l'observation que nous avons faite, à savoir que l'acide sulfureux possède un spectre d'absorption dans l'ultra-violet, et que celui-ci se modifie par l'addition de composés à fonction sulfhydryle. Cette constatation laisse prévoir la formation d'un complexe, dont nous avons étudié les propriétés par spectrophotométrie. Au préalable, il a été nécessaire de préciser le spectre d'absorption des solutions diluées d'acide sulfureux en fonction du pH, puisque ces données faisaient défaut dans la littérature.

I. — Spectre de l'acide sulfureux.

a) Résultats antérieurs

Les données concernant les spectres ultraviolets de l'acide sulfureux et de ses sels sont restées assez confuses, jusqu'à ces dernières années. Nous voyons à cela deux raisons, la première c'est que les résultats varient avec l'acidité des solutions, ce qui fait que les données expérimentales n'ont pu être interprétées tant que la notion de pH n'a pas été connue. La seconde, c'est la facilité avec laquelle il s'oxyde, diminuant la concentration présente au début de l'expérience et remplaçant un acide faible par un acide plus fort, qui abaisse le pH et modifie doublement les résultats.

Les solutions de sulfite neutre ne présentent pas de maximum d'absorption caractéristique. Tous les auteurs sont d'accord sur ce point : (10) (34) (91). Buck et ses collaborateurs (10) notent simplement une absorption continue au-dessous de 280 mμ.

D'après Garrett (34), les solutions aqueuses de sulfite acide de potassium présentent un maximum d'absorption à 276 mμ et un mini-

mum à 233 mμ. Les valeurs de l'extinction moléculaire exprimées dans les unités suivantes

$$\varepsilon = \frac{1}{c\,d} \log \frac{I^0}{I}$$

sont respectivement

$$\log \varepsilon\ 276 = 1{,}62\ \text{cm}^2\ \text{mol.}^{-1}$$
$$\log \varepsilon\ 233 = 0{,}21\ \text{cm}^2\ \text{mol.}^{-1}$$

VALYASHKO et CHESHKO (85) donnent pour les solutions aqueuses de sulfite acide de sodium les valeurs suivantes :

$$\text{maximum } \log \varepsilon\ 273 = 1{,}204$$
$$\text{minimum } \log \varepsilon\ 233 = 0{,}690$$

Les résultats sont moins clairs en ce qui concerne l'anhydride sulfureux et ses solutions. Les maximum d'absorption sont les suivants d'après GARRETT (34)

SO_2 gazeux	à 296 mμ
SO_2 liquéfié	285 mμ
SO_2 en solution aqueuse	277 mμ

et la valeur des extinctions moléculaires à 276 mμ

$$\text{pour } SO_2 \quad \log \varepsilon = 2{,}16$$
$$\text{pour } SO_3H_2 \quad \log \varepsilon = 2{,}34$$

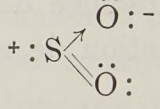
Les recherches plus récentes de VALYASHKO et CHESHKO (85) confirment la position de maximum à 290-287 mμ pour les solutions d'anhydride sulfureux dans le pentane ou dans l'eau, mais les coefficients d'extinction moléculaire sont beaucoup plus forts que ceux proposés jusqu'ici :

Dans le pentane

$$\text{au maximum } \log \varepsilon\ 290 = 3{,}806$$
$$\text{au minimum } \log \varepsilon\ 245 = 2{,}097$$

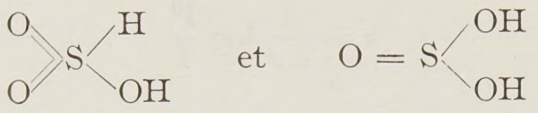
Dans l'eau, la position du maximum d'absorption ne change pas, mais le coefficient d'extinction moléculaire est 64 fois plus faible.

Une interprétation de ces résultats peut être donnée à partir des observations de LORENZ et SAMUEL (55), qui ont montré que l'absorption spécifique se retrouve chez les composés tétravalents du soufre. Or l'anhydride sulfureux dont la structure moléculaire peut être schématisée de la façon suivante :



permettrait les oscillations électroniques responsables du spectre observé. En ce qui concerne le spectre de l'acide sulfureux, les travaux effectués

jusqu'ici ne permettent pas de dire s'il provient d'une absorption propre des formes tautomères que l'on admet généralement



ou bien d'une certaine quantité d'anhydride qui est toujours en équilibre avec l'acide dans les solutions.

Des renseignements supplémentaires sur la constitution ionique et moléculaire des solutions acides de sulfite ont été apportés par Simon et Waldmann (72) (73) au moyen du spectre Raman. En travaillant sur des solutions concentrées de pyrosulfite, ces auteurs ont pu mettre en évidence par leur fréquence Raman, les composés suivants :

$S_2O_5^=$ (1)

$H - SO_3^-$ (2)

SO_2 et SO_2xH_2O (3)

$HO - SO_2^-$ (4)

Se trouvent ainsi confirmées, l'existence des deux formes tautomères (2) et (4) des ions métabisulfites bisulfites et la présence en solution d'anhydride ou plutôt d'anhydride hydraté.

b) **Résultats personnels.**

Préparation des échantillons.

Afin de se prémunir contre les erreurs que pourraient introduire des impuretés présentes dans les échantillons utilisés, nous avons préparé au laboratoire du sulfite de sodium et purifié un produit commercial.

Le sulfite de sodium a été préparé de la façon suivante. On constitue un générateur à anhydride sulfureux en laissant tomber goutte à goutte de l'acide sulfurique R. P. dans une solution saturée et chaude de métabisulfite de potassium purifié « Prolabo ». Le gaz dégagé est lavé par barbottage dans une petite quantité d'eau. Après avoir purgé l'appareil de l'air qu'il contient, on fait barbotter le gaz sulfureux dans une solution de soude R. P. à 10 p. 100. Après complète neutralisation, le sulfite de sodium est cristallisé dans l'eau à trois reprises, lavé à l'eau glacée et séché sous NaOH.

Du sulfite de sodium pur, cristallisé « Probalo » a subi trois cristallisations successives en vue de sa purification. L'eau utilisée dans ces opérations avait été fraîchement distillée dans un appareil de verre, afin d'éviter au maximum l'introduction de métaux lourds et de cuivre en particulier.

On a donc disposé de deux échantillons qui correspondent à l'hydrate SO_3Na_2, 7 H_2O et contiennent un peu de sulfate qui ne s'est pas montré

gênant, puisqu'il na pas de spectre propre. La normalisation des solutions a été faite par titrage à l'iode, dans les conditions déjà indiquées.

Ces deux échantillons ont peu de chance de contenir exactement les mêmes impuretés. Comme des solutions d'égale concentration en sulfite et amenées au même pH donnent des spectres identiques, nous en avons conclu que l'absorption observée dans l'ultra-violet est bien due à l'une des formes de l'acide sulfureux contenue dans la solution et non pas à des impuretés.

Une seconde preuve est fournie par l'expérience dont les résultats sont rapportés dans le tableau XXXII.

Tableau XXXII

Absorption de solutions d'acide sulfureux partiellement oxydées.

	échantillon n°				
	1	2	3	4	5
SO_3Na_2 ajouté en μ mol/ml.....	4,48	4,48	4,48	2,24	1,12
I ajouté en μ mol/ml	0	44,8	6,72	0	0
SO_2 restant après la réaction	4,48	2,24	1,12	2,24	1,12
Densité optique à 275 m μ	1,41	0,71	0,355	0,72	0,375

Toutes les solutions sont faites dans l'acide phosphorique 0,25 M,
Cuve quartz 1 × 1 cm. Absorption mesurée par rapport à l'acide phosphorique 0,25 M

Il apparaît que l'absorption dans l'ultra-violet diminue lorsque le sulfite est partiellement oxydé par l'iode et qu'elle ne dépend que de la quantité de sulfite restant dans le liquide. En particulier, lorsqu'on compare les échantillons 2 et 4, et 3 et 5, qui contiennent la même quantité d'acide sulfureux, on remarque qu'ils présentent des absorptions identiques aux erreurs de mesure près. Il n'en serait pas ainsi, si l'absorption était due à une impureté contenue dans la préparation de sulfite, car l'échantillon 4 par exemple a reçu deux fois moins de sulfite que le 2 et devrait donc présenter une absorption 2 fois plus forte.

Nous pensons que ces précautions et ces expériences doivent rendre absolument certaine l'existence d'un spectre d'absorption dans l'ultra-violet pour les solutions de sulfite en milieu acide.

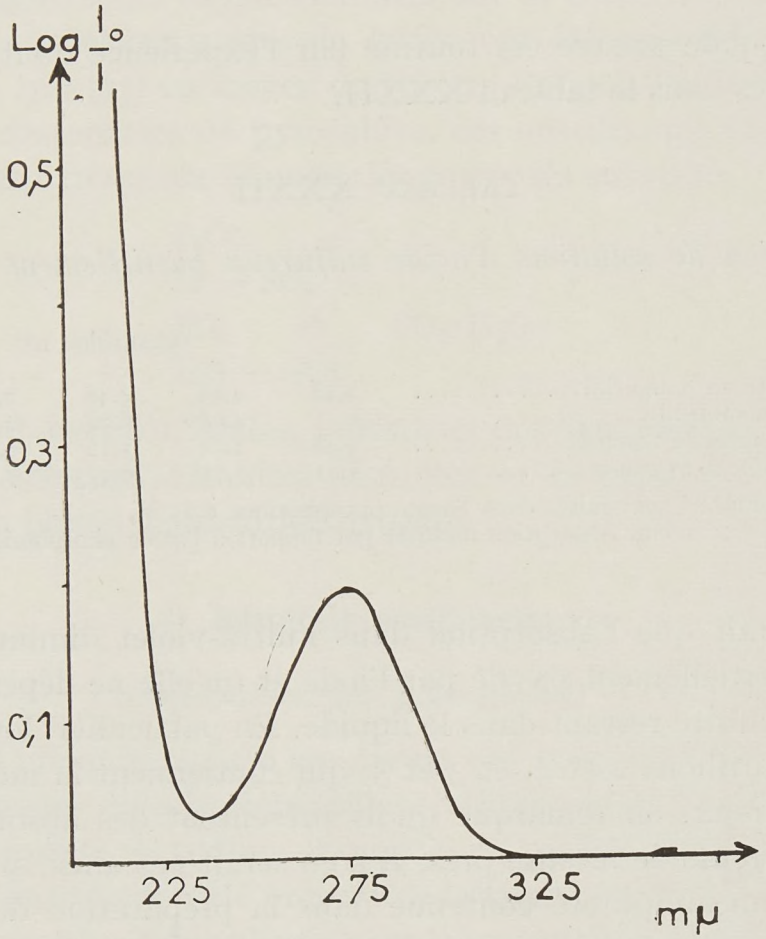
Forme du spectre.

Le spectre d'une solution acide de sulfite a été enregistré entre 220 et 375 mμ. Il est reproduit sur le graphique 12.

L'enregistrement montre une bande d'absorption centrée à 275 mμ. On n'a pas jugé nécessaire de calculer la constante moléculaire d'absorption à partir de ces résultats, car comme on le verra par la suite, elle varie avec le pH et ne présente donc pas d'intérêt. Les résultats contenus dans le tableau XXXII indiquent que l'absorption à 275 mμ suit la loi de Beer, lorsque le pH ne varie pas.

Variation du spectre en fonction du pH.

Nos mesures ont confirmé que le sulfite ne donne pas de bande d'absorption en milieu neutre. En revanche en milieu acide, on voit apparaître le maximum d'absorption à 275 mμ, quel que soit l'acide utilisé : acide citrique, phosphorique ou chlorhydrique. Ceci prouve que l'absorption constatée n'est pas due à une combinaison avec les acides présents dans les tampons, mais doit être rapportée à une forme particulière de l'acide sulfureux.



GRAPHIQUE 12. — Spectre d'une solution acide de sulfite. Solution de sulfite de Na purifié 5 μ mol/m dans un tampon phosphate 0,05 M, pH 2,70 après mélange dans une cuve de 1 cm d'épaisseur. Le témoin est réalisé avec le tampon au même pH et à la même dilution.

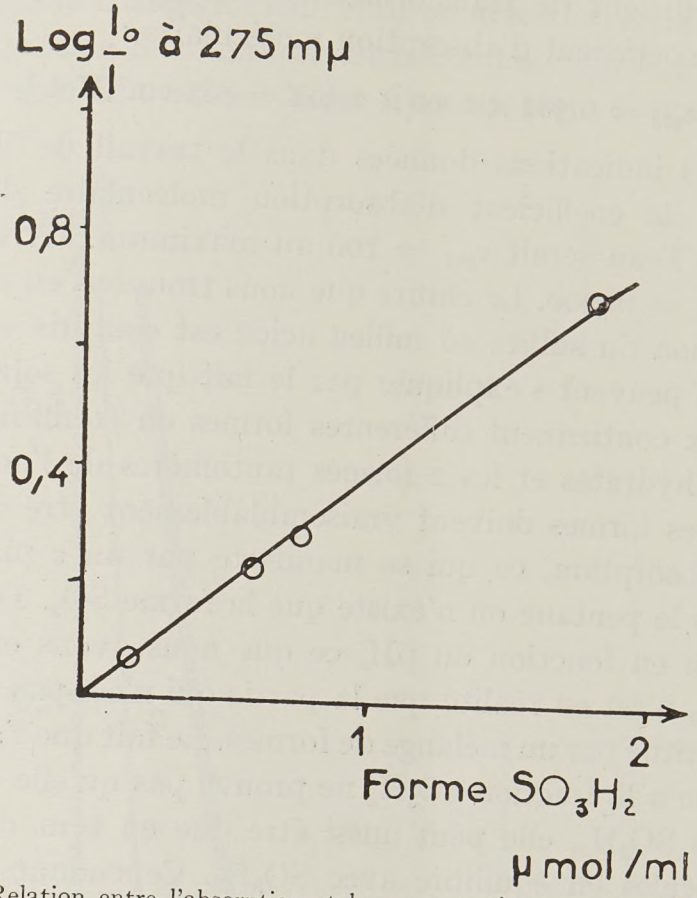
Signification de l'absorption à 275 mμ.

Nous avons vu que les sulfites en milieu acide peuvent exister au moins sous quatre formes différentes :

1° de SO_2 dissous et ses hydrates ;
2° de SO_3H_2 ;
3° de SO_3H^- ;
4° de $SO_3^=$.

On a donc recherché s'il n'est pas possible de faire correspondre les valeurs de l'absorption à la concentration en l'une de ces formes.

Le graphique 13 indique clairement, qu'il existe une relation de



GRAPHIQUE 13. — Relation entre l'absorption et la concentration en acide sulfureux non dissocié. Mêmes conditions que celles indiquées au tableau XXXIII.

TABLEAU XXXIII

Relation entre l'absorption à 275 mμ et la forme non dissociée de l'acide sulfureux.

pH	log $\frac{I^o\ 275}{I}$	% de forme SO_3H_2	μmol/ml de forme SO_3H_2 dans la solution
2,02	0,702	35,77	1,79
2,52	0,277	15,18	0,759
2,65	0,217	11,67	0,584
3,21	0,0625	3,48	0,174
4,07	0,010	0,57	0,0275

Solution contenant 5 μmol/ml de SO_3Na_2, tampon phosphate de potassium acide phosphorique 0,15 M. Le pH des diverses solutions mesuré à l'électrode de verre, cuves de 1 cm d'épaisseur.

stricte proportionnalité entre l'absorption à 275 mμ et la forme SO_3H_2 calculée à partir du pH et des constantes de dissociation de l'acide sulfureux (voir p. 277).

On peut donc à partir du graphique 13 déterminer le coefficient d'absorption moléculaire pour cet acide.

Pour une concentration en acide sulfureux non dissocié de 1 μ mol/ml on trouve une absorption $\log \frac{I^o}{I} = 0{,}382$ pour 1 cm d'épaisseur. En tenant compte du coefficient de transformation en logarithmes népériens, on trouve comme coefficient d'absorption moléculaire :

$$\varepsilon_{275} = 0{,}382 \times 1000 \times 2{,}302 = 881 \text{ cm}^2 \text{ Mol}^{-1}$$

D'après les indications données dans le travail de VALYASHKO et CHESHKO (85), le coefficient d'absorption moléculaire de l'anhydride sulfureux dans l'eau serait $\varepsilon_{285} = 100$ au maximum. La valeur dans le pentane est $\varepsilon_{290} = 64000$. Le chiffre que nous trouvons en tenant compte de la dissociation du sulfite en milieu acide est compris entre les deux. Ces différences peuvent s'expliquer par le fait que les solutions d'anhydride sulfureux contiennent différentes formes en équilibre : anhydride dissous et ses hydrates et les 2 formes tautomères de l'acide sulfureux. Certaines de ces formes doivent vraisemblablement être dépourvues de propriétés d'absorption, ce qui se manifeste par un ε plus faible dans l'eau que dans le pentane où n'existe que la forme SO_2. Dans les calculs de dissociation en fonction du pH, ce que nous avons englobé sous la formule SO_3H_2 n'est en réalité que la partie qui n'est pas SO_3H^- ou SO_3, peut être constitué par un mélange de formes. Le fait que l'absorption soit proportionnelle à la fraction SO_3H_2 ne prouve pas qu'elle est en fait due aux molécules SO_3H_2, elle peut aussi être due en tout ou en partie, à d'autres molécules en équilibre avec SO_3H_2. Cependant, comme la loi de Beer Lambert est vérifiée en solution diluée, on doit admettre aussi que la dilution a peu d'influence sur l'équilibre des composés responsables de l'absorption.

II. — Spectres de la cystine, de la cystéine et de l'acide cystéine S-sulfonique.

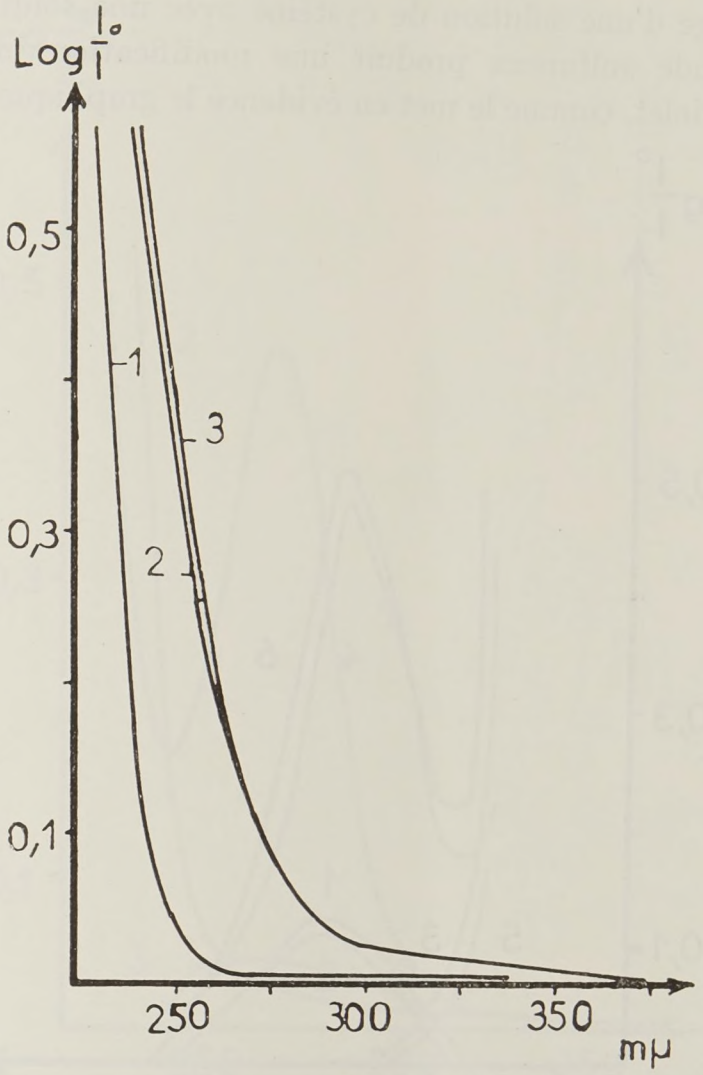
Les données concernant la cystine et la cystéine sont assez nombreuse et en général concordantes. Elle ont été passées en revue par BEAVEN et HOLIDAY (7), et nous nous contenterons de citer les résultats de FROMAGEOT et SCHNEK (33) qui doivent nous permettre par la suite d'interpréter nos propres mesures.

La cystéine ne présente pas de bande d'absorption caractéristique. D'après CALVIN (12) son absorption jusqu'à 250 mμ est négligeable en milieu chlorhydrique 0,1 ou même 12 N. On n'aura pratiquement pas à en tenir compte dans nos expériences.

L'absorption générale de la cystine est plus importante. Elle se manifeste déjà à 300 mμ et présente un faible maximum à 240 mμ. Le maximum n'est nettement perceptible qu'en milieu alcalin. En milieu acide, on ne perçoit qu'un épaulement à cette longueur d'onde.

Dans nos expériences, nous avons utilisé le chlorhydrate de cystéine « Roche ». Les solutions ont été faites 0,02 M par pesées et amenées au pH désiré. On n'a utilisé que des solutions fraîchement préparées. On a aussi vérifié que le titrage à l'iode était en accord avec la pesée.

L'acide cystéine S-sulfonique est le composé qui apparaît lorsque le sulfite réagit sur la cystine. Nous n'avons trouvé aucune indication



GRAPHIQUE 14. — Spectre d'adsorption.
1. Cystéine 0,008 M dans PO_4H_3 0,02 M.
2. Cystéine S-sulfonate de NH_4 0,0077 M dans PO_4H_3 0,016 M.
3. Cystéine S-sulfonate de NH_4 0,0077 M dans NaOH 0,016 M.
Cuve de 1 cm d'épaisseur. Comme témoins PO_4H_3 ou NaOH à la même dilution.

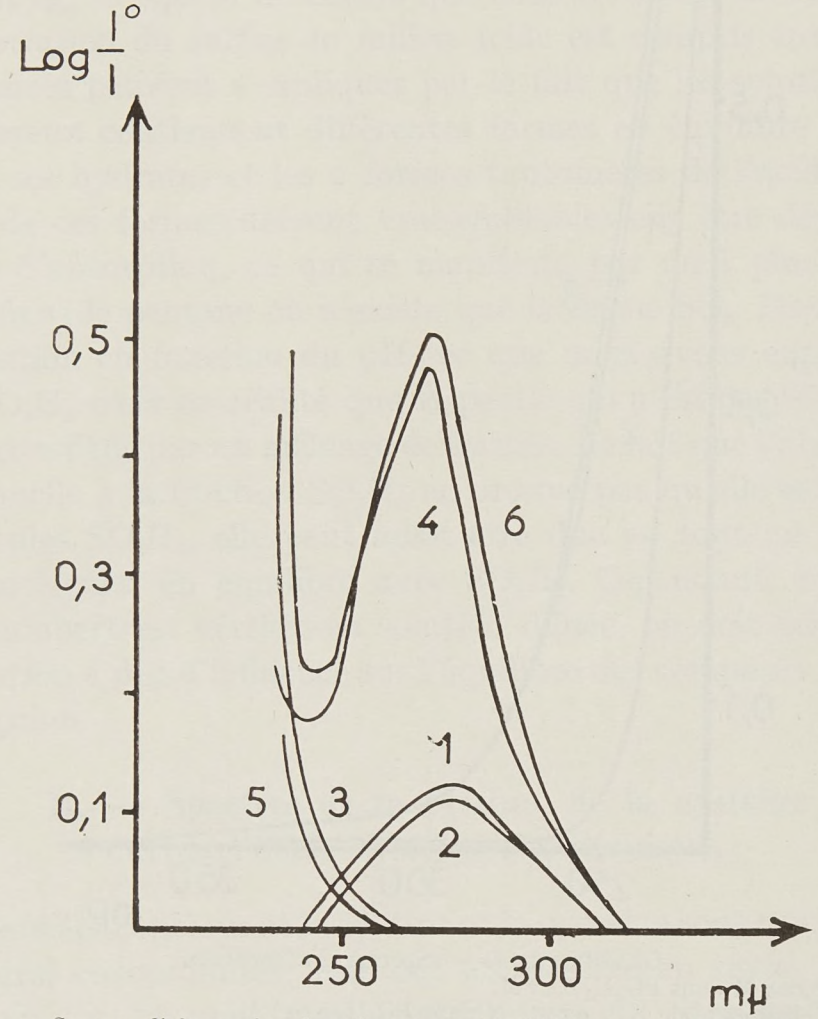
concernant son spectre d'absorption. Or ce produit est susceptible de se former dans nos expériences, car l'on n'est jamais sûr que les solutions de cystéine que l'on utilise ne contiennent pas de faibles quantités de cystine, qui prennent naissance par oxydation.

En suivant la technique indiquée par CLARKE (16), on a préparé un échantillon cristallisé de cystéine S-sulfonate d'ammonium. Le spectre ultra-violet de ce produit a été déterminé en milieu acide et en milieu basique et tracé sur le graphique 14.

Il est dépourvu de bande d'absorption caractéristique et ressemble en cela à celui de la cystine. Il n'est cependant pas possible de percevoir à 250 mμ l'épaulement que l'on attribue généralement à l'existence d'une liaison disulfure, qui ne doit pourtant pas faire défaut dans ce composé.

III. — Spectre de la combinaison cystéine-acide sulfureux.

Le mélange d'une solution de cystéine avec une solution de sulfite acide ou d'acide sulfureux produit une modification importante du spectre ultra-violet, comme le met en évidence le graphique 15.

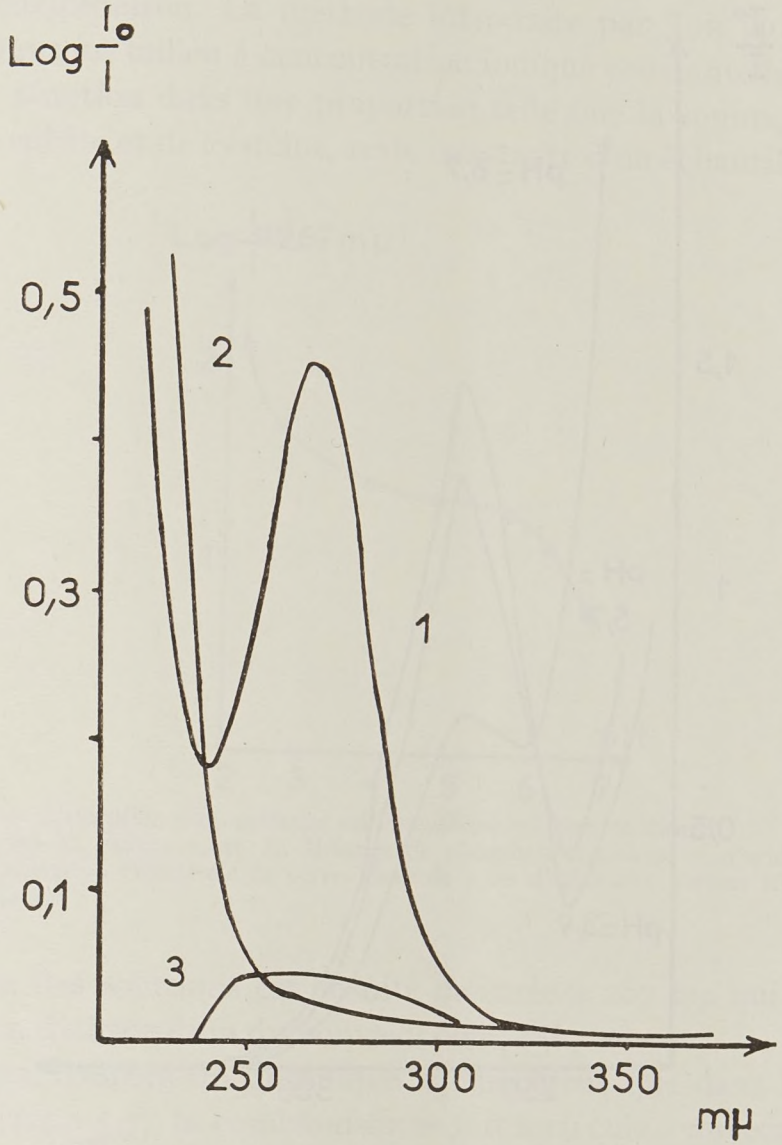


GRAPHIQUE 15. — Spectre d'absorption dans le tampon Mc Ilvaine 0,026 M pH 2,6.
1. Sulfite de sodium 0,0033 M. — 2. Sulfite de sodium + Glycocolle 0,0033 M. — 4. Sulfite de sodium + Glutathion 0,0033 M. — 6. Sulfite de sodium + Cystéine 0,0033 M. — 3. Glutathion 0,0033 M. — 5. Cystéine 0,0033 M. — Cuve de 1 cm d'épaisseur. Comme témoin tampon à la même dilution.

On en a déduit qu'il doit se former un complexe responsable de cette absorption. La même modification se retrouve lorsque la cystéine est remplacée par le glutathion réduit. Au contraire aucun changement n'est observé lorsqu'on mélange le sulfite à une solution saturée, acide, de cystine ou d'un autre acide aminé tel que le glycocolle.

Ces observations nous ont amené à admettre l'existence d'une combinaison de l'acide sulfureux avec les fonctions thiols.

Dans les expériences qui vont suivre, la cystéine a été choisie comme modèle de corps contenant une fonction thiol. Elle offre sur le glutathion l'avantage d'avoir un spectre beaucoup plus simple, puisqu'il lui est impossible de former comme ce dernier en milieu acide un noyau thiazoline, qui donne justement une bande d'absorption entre 260 et 270 mμ, qui risque de se confondre avec celle due à la réaction du sulfite. Le graphique 16



GRAPHIQUE 16. — Spectre d'absorbtion dans le tampon Mc Ilvaine pH 3, concentration en P O_4H 0,008 M. — 1. Cystéine 0,004 M + sulfite 0,004 M. — 2. Cystéine 0,008 M. — 3. Sulfite 0,08 M. — Cuve de 1 cm d'épaisseur. Comme témoin tampon à la même dilution.

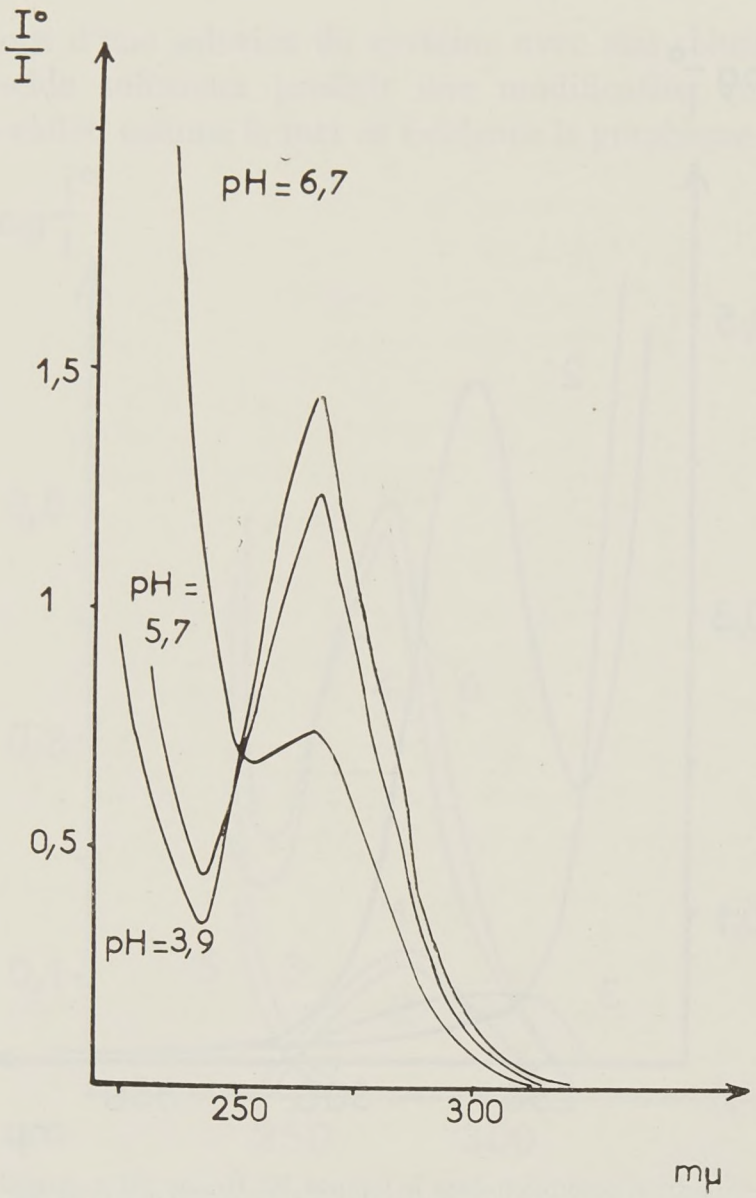
reproduit trois spectres : celui de la cystéine (2), celui de l'acide sulfureux (3) et celui obtenu en mélangeant ces deux solutions (1).

Les diverses solutions ont été faites dans un même tampon pH 3 et les absorptions déterminées par rapport à ce tampon.

Le spectre du mélange ne peut être déduit de l'addition des spectres de chacun des composants. Son maximum à 267 mμ est légèrement déplacé par rapport à celui de l'acide sulfureux, 275 mμ. D'autre part son intensité est augmentée d'environ 10 fois.

a) Influence du pH.

L'influence du pH a été étudiée en mélangeant les mêmes solutions dans des tampons différents. Le graphique 17 indique que le maximum se maintient à 267 mμ lorsque le pH varie de 3,9 à 6,7.



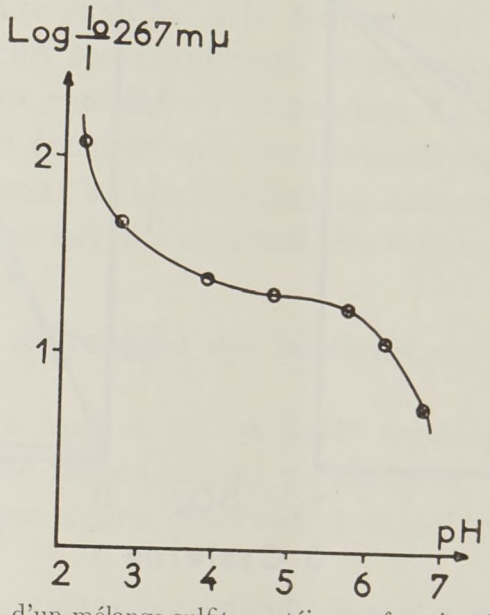
GRAPHIQUE 17. — Spectre d'un mélange cystéine-sulfite à divers pH. Cystéine 0,016 M. Sulfite 0,016 M. Mélange phosphate disodique acide phosphorique 0,1 M.
pH mesuré à l'électrode de verre.
Cuve de 1 cm d'épaisseur. Comme témoin mélange à la même dilution.

Il montre aussi l'existence d'un point isobestique, ce qui indique que la solution comporte deux composés absorbants en équilibre.

La courbe des absorptions maximum à 267 mμ en fonction du pH, reproduite sur le graphique 18, montre qu'autour de pH 5, l'absorption varie peu avec le pH.

b) Étude de la combinaison par la méthode des variations continues.

La facilité avec laquelle il est possible de suivre la réaction par spectrophotométrie, nous a incité à utiliser la méthode des variations continues pour obtenir des renseignements supplémentaires et quantitatifs sur cette combinaison. La méthode introduite par Job (46), consiste à mélanger dans un milieu à concentration ionique constante les deux corps entrant en réaction dans une proportion telle que la somme des concentrations de sulfite et de cystéine, reste constante d'un échantillon à l'autre.



Graphique 18. — Absorption d'un mélange sulfite-cystéine en fonction du pH. Cystéine 0,016 M. Sulfite 0,016 M. Mélange de phosphate disodique et d'acide phosphorique 0,1 M. pH mesuré à l'électrode de verre. Cuve de 1 cm d'épaisseur. Comme témoin mélange à la même dilution.

L'absorption des solutions est ensuite mesurée à 267 mμ qui correspond au maximum d'absorption du nouveau composé.

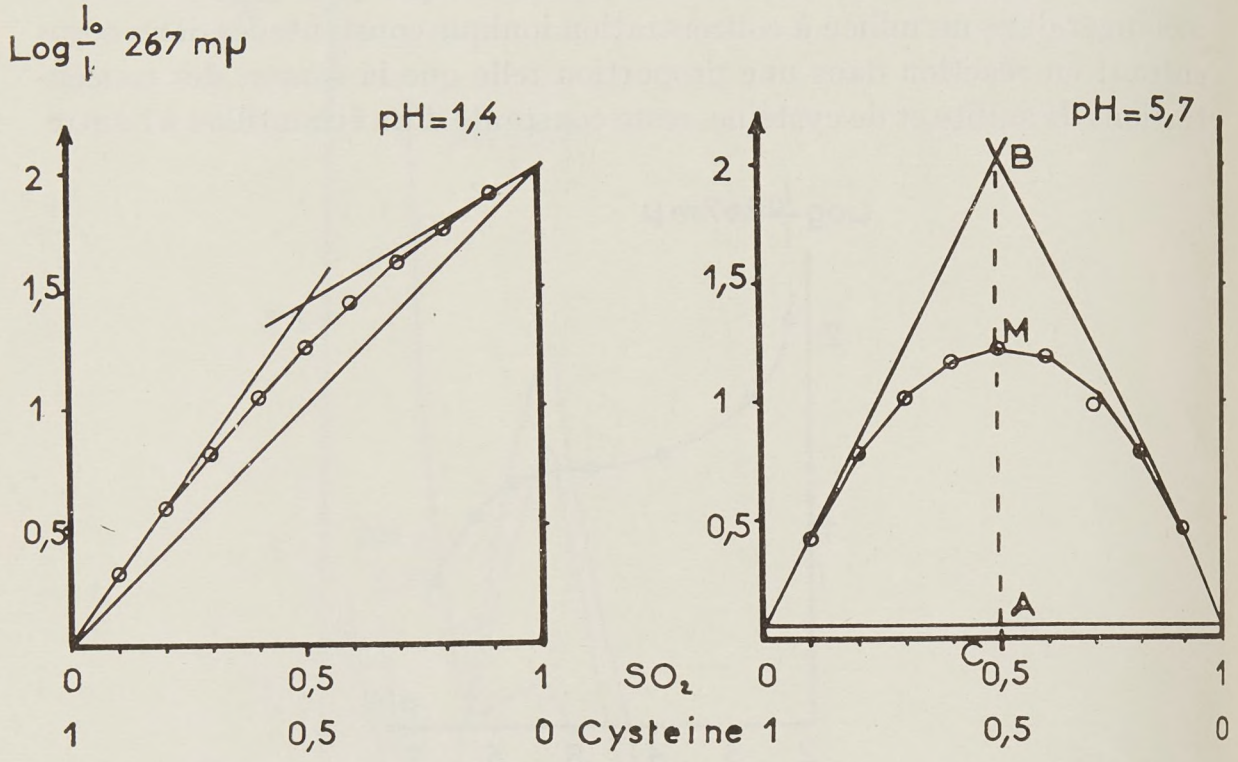
Les deux courbes du graphique 19 montrent que dans la zone des pH utilisés (1,4 à 5,7), la combinaison se fait molécule à molécule, puisque le maximum d'absorption est atteint lorsque la concentration en cystéine égale celle en acide sulfureux.

Les tangentes aux points $|SO_2| = O$ et $|\text{cystéine}| = O$ représentent la variation de la densité optique si la combinaison était totale, alors que la droite qui joint les points $|SO_2| = O$ et $|\text{cystéine}| = O$ représente les variations de la densité optique s'il n'y avait pas de combinaison. La comparaison de la courbe expérimentale à ces deux limites permet de déterminer la dissociation de la combinaison.

A la concentration équivalente, MA est proportionnel à la quantité de complexe non dissocié, alors que MB est proportionnel à la quantité dissociée.

Il est donc possible de déterminer à partir du graphique le coefficient de dissociation α, c'est-à-dire le rapport entre le nombre de molécules dissociées et le nombre total de molécules qui existeraient si le complexe était parfait.

$$\alpha = \frac{MB}{MA + MB}.$$



GRAPHIQUE 19. — Méthode des variations continues appliquée à des solutions de cystéine et de sulfite.
1° Dans l'acide phosphorique 0,2 M, concentration cystéine + sulfite 0,008 M. pH 1,4 mesuré à l'électrode de verre.
2° Dans un tampon phosphate 0,12 M, pH 5,7 concentration cystéine + sulfite 0,016 M.
Mesures faites dans des cuves de 1 cm d'épaisseur. Comme témoin le tampon ou l'acide à la même dilution.

On a au point C, où les concentrations des deux constituants sont égales :

(ac. sulfureux) = (cystéine) = (complexe dissocié).

D'autre part, la concentration qu'atteindrait le complexe, s'il n'était pas dissocié, est égale à c, concentration des deux constituants au point C. On a donc,

$$\text{(ac. sulfureux)} = \text{(cystéine)} = \text{(complexe dissocié)} = \alpha c$$
$$\text{(complexe non dissocié)} = (1 - \alpha)\, c.$$

D'où la constante d'équilibre de la réaction suivante :

$$\text{Acide sulfureux} + \text{Cystéine} \Leftrightarrow \text{Complexe}$$
$$K = \frac{\alpha c \times \alpha c}{(1-\alpha)c} = \frac{\alpha^2}{(1-\alpha)} c.$$

Les déterminations ont été faites suivant cette méthode à quatre pH différents et les résultats obtenus sont les suivants :

pH 1,4	K = 0,0011 M
pH 2,7	K = 0,0013 M
pH 4,0	K = 0,0017 M
pH 5,7	K = 0,0022 M

c) Réversibilité de la réaction.

En milieu acide, la réaction de la cystéine sur l'acide sulfureux se fait avec une grande rapidité à la température ambiante. La densité optique a déjà atteint son maximum, 30 secondes après le mélange, au moment où l'on peut commencer les mesures. La réaction est facilement réversible. Ainsi, on constate que les dilutions de mélanges équimoléculaires d'acide sulfureux et de cystéine ne suivent pas la loi de BEER-LAMBERT. La réaction inverse est aussi très rapide.

IV. — Spectre différentiel des bactéries en présence de sulfite.

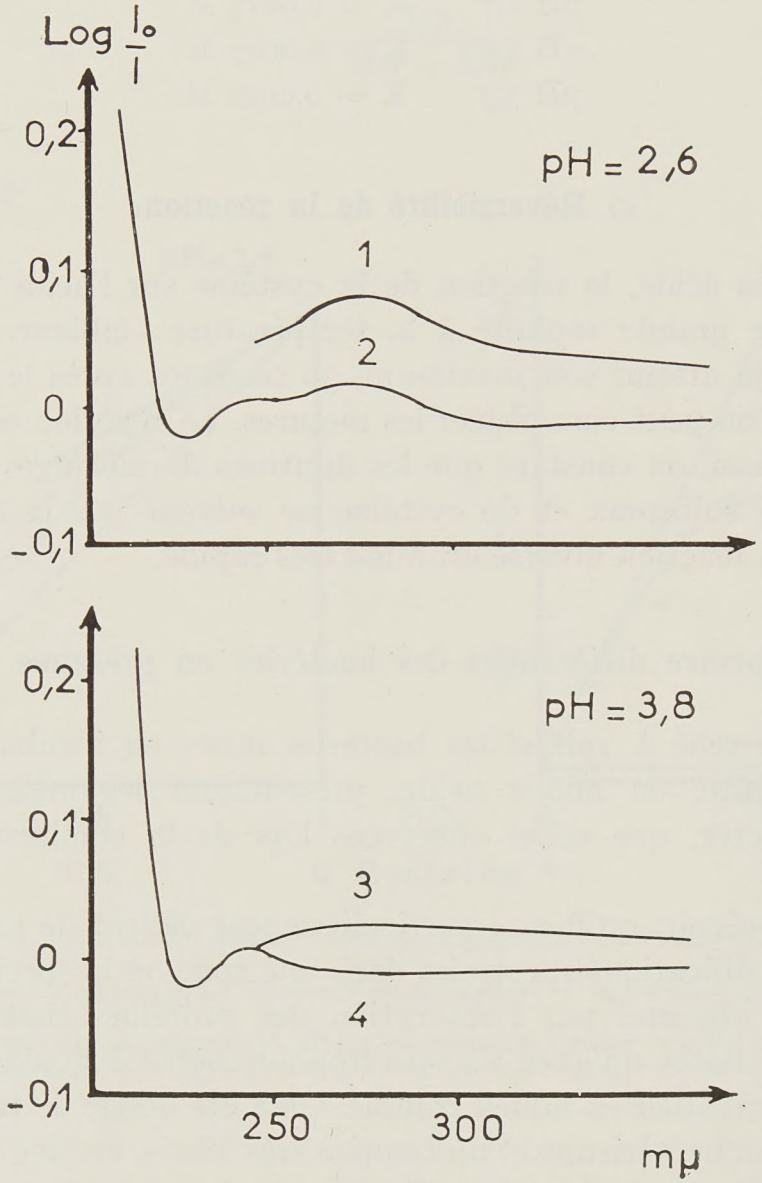
On a cherché à voir si les bactéries mises en incubation en présence de sulfite, en milieu acide, présentaient les mêmes modifications de spectre, que celles observées lors de la combinaison sulfite-cystéine.

Il faut prévoir, qu'il sera particulièrement délicat de mettre en évidence des modifications spectrales dans une zone où le spectre est considérablement obscurci par l'absorption des protéines. Les mesures ne peuvent être faites qu'avec un spectrophotomètre à double rayon permettant de travailler en milieu trouble. On a été obligé de travailler avec une suspension bactérienne et un tampon très dilués, de façon à permettre la transmission d'une énergie suffisante pour que la fente d'entrée de l'appareil reste dans des limites acceptables pour son bon fonctionnement. Malgré cela, nous n'attribuons aux courbes du graphique 20 qu'une valeur qualitative. Elles montrent, que l'addition de bactéries à des solutions d'acide sulfureux augmente l'absorption vers 270 mμ, et cela d'autant plus que le milieu est plus acide.

DISCUSSION DES RÉSULTATS

Les expériences qui viennent d'être décrites démontrent bien qu'il existe en milieu acide, une combinaison entre l'acide sulfureux et les composés possédant une fonction thiol. L'instabilité de ce complexe ne permet pas de l'isoler du milieu dans lequel il se forme. C'est ainsi que

la chromatographie sur papier de solutions contenant le complexe, n'a jamais fourni que des taches de sulfite et de cystéine. La structure chimique de ce corps sera donc difficile à préciser, puisque nous n'avons

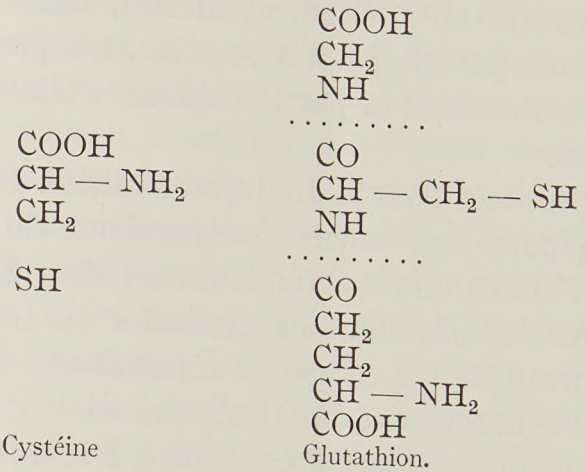


GRAPHIQUE 20. — Spectre différentiel des bactéries avec et sans sulfite.
A pH 2,6. Tampon Mc Ilvaine, concentration en PO_4 0,002 M.
Bactéries 0,17 mg/ml. Sulfite 2 μ mol/ml.
1. Spectre de différence bactéries + sulfite par rapport aux bactéries seules.
2. Spectre de différence tampon + sulfite par rapport au tampon seul.
A pH3,8. Tampon Mc Ilvaine, concentration en PO_4 0,007 M.
3. Comme 1.
4. Comme 2.
Mesures faites dans des cuves de 1 cm d'épaisseur.

pu utiliser aucune des méthodes chimiques de l'analyse fonctionnelle. On en sera donc réduit à des conjectures et à rechercher une explication vraisemblable aux propriétés que nous avons observées.

Le fait que les solutions de glutathion et de cystéine, en présence d'acide sulfureux et au même pH, conduisent à des résultats identiques au point de vue position du maximum d'absorption et coefficient d'absorp-

tion moléculaire, nous indique que seule la fonction thiol doit intervenir dans la réaction.



Cystéine Glutathion.

En effet, dans le glutathion, ni la fonction amine, ni la fonction acide de la cystéine ne peuvent réagir, puisqu'elles sont engagées toutes deux dans des liaisons peptidiques. On a aussi constaté que le glycocolle qui comporte ces deux fonctions libres, ne donne pas de spectre caractéristique en présence d'acide sulfureux. Or, si l'on se rapporte à ce que nous savons de la chimie des mercaptans et en particulier de ceux ayant une importance en chimie biologique, il faut admettre qu'ils sont très réactifs. BARLTROP, HAYES et CALVIN (5) signalent leur réaction sur le sulfure de carbone

$$R - SH + S = C = S + OH \rightarrow R - S - \overset{\overset{S}{\|}}{C} - S^- + H_2O$$

qui se produit en milieu légèrement alcalin et conduit à un alkyl-trithiocarbonate. La réaction est complète et instantanée. Elle est mise en évidence par l'apparition de maximum d'absorption à 300 et 335 mμ. La formation de ce composé est réversible. D'après CALVIN (12), une réaction analogue se produirait vraisemblablement avec CO^3, elle conduirait à la formation de S-alkyl monothiocarbonate, stable en milieu alcalin et libérant CO_2 en milieu acide. A notre connaissance, cette hypothèse n'a pas encore donné lieu à des travaux expérimentaux.

Avec l'acide sulfureux, on peut prévoir la formation d'un thiolester. Dans le cas de la cystéine on aurait la réaction suivante :

$$HOOC - \underset{\underset{NH_2}{|}}{CH} - CH_2 - SH + SO_3H_2$$

$$\leftrightarrows HOOC - \underset{\underset{NH_2}{|}}{CH} - CH_2 - S - S\overset{\overset{O}{\|}}{\underset{OH}{\diagdown}} + H_2O$$

Cette réaction est analogue à celle qui a été utilisée par WIELAND et KÖPPE (90) pour la synthèse du lactoylglutathion par exemple.

Les thiolesters décrits par STADTMAN (79) possèdent aussi une absorption particulière vers 230-240 mμ, due à la liaison R-CO-S-R, qui est stable en milieu neutre ou légèrement alcalin, mais qui disparaît ou est fortement atténuée par une hydrolyse acide. Les propriétés spectrales que nous avons décrites dans la partie expérimentale diffèrent de celles des alkyl-thiolesters.

La structure proposée pour le produit d'addition de l'acide sulfureux sur la cystéine comporte une molécule tétravalente de soufre, à laquelle on peut attribuer l'absorption spécifique dans l'ultraviolet, ce qui est en parfait accord avec les observations générales de LORENZ et SAMUEL (55), qui ont montré que les composés tétravalents du soufre sont les seuls à présenter une absorption dans l'ultraviolet.

L'instabilité du produit formé est tout à fait analogue à celle que présentent les divers esters de l'acide sulfureux. C'est ainsi que le sulfite d'éthyle préparé par ARBUSOW (4) se détruit rapidement en milieu aqueux. Le sulfite de glycol est aussi instable, mais sa décomposition est plus lente, surtout en milieu neutre. Des esters sulfureux vraiment stables ne sont signalés par PECHUKAS (66) qu'avec des corps tels que le glycidol (2-3 epoxy I-propanol). La réversibilité se retrouve aussi bien dans la réaction des thiols sur l'acide sulfureux que dans celle sur le sulfure de carbone.

Nous avons donc là des arguments qui permettent de penser que le produit de la réaction de l'acide sulfureux sur la cystéine est bien un thiolester de l'acide sulfureux.

CONCLUSION

Explication du mode d'action de l'acide sulfureux en tant qu'inhibiteur.

Nous avons pu montrer que l'acide sulfureux est un inhibiteur de l'oxydation de l'éthanol par *A. rancens*. C'est là un résultat nouveau puisque jusqu'ici on avait surtout signalé son action bactéricide sur les micro-organismes. L'inhibition se fait en milieu acide et paraît ne faire intervenir que les formes SO_3H_2 et SO_3H^-, l'acide sulfureux étant beaucoup plus actif que les ions bisulfites. Elle est réversible dans une large mesure si l'incubation n'a pas été trop prolongée et la dose trop importante.

Pour expliquer son action, plusieurs propriétés de l'acide sulfureux ou de ses dérivés ont été avancées. Au terme de cette étude, nous allons passer successivement en revue ces hypothèses et rechercher dans quelle mesure elles sont susceptibles de rendre compte des observations que nous avons rapportées.

Propriétés réductrices.

JOSLYN et BRAVERMANN (48) considèrent en 1954 que le mode d'action de l'acide sulfureux en tant qu'agent de conservation est inconnu. Ils croient qu'il pourrait découler de ses propriétés réductrices, susceptibles d'abaisser la tension d'oxygène à un point incompatible avec la croissance des organismes aérobies ou susceptibles de maintenir à l'état réduit un système enzymatique indispensable à la croissance. Par leur pouvoir réducteur, les sulfites peuvent en effet, s'opposer à certains phénomènes biologiques. C'est ainsi qu'ils inhibent l'oxydation du catéchol comme l'ont montré BRANCH et JOSLYN (8). DOWNER (23) a aussi montré qu'ils empêchent l'oxydation de l'acide ascorbique présent dans les végétaux. Il est donc tentant d'expliquer leur action sur les microorganismes, en imaginant qu'ils réduisent entièrement certains composés intermédiaires, bloquant ainsi le mécanisme normal des oxydo-réductions. Nous avons trouvé que des substances fortement réductrices, comme l'acide ascorbique, la cystéine sont sans effet sur la réaction étudiée. D'autre part les propriétés réductrices des sulfites existent aussi bien en milieu neutre qu'en milieu acide, ce qui ne rend pas compte du fait que l'inhibition ne se produit qu'en milieu acide. On a aussi montré que l'augmentation de la tension d'oxygène ne modifie pas le taux de l'inhibition. Pour toutes ces raisons il semble qu'un mode d'action faisant intervenir les propriétés réductrices ne puisse être retenu dans ce cas.

Modification de la perméabilité des membranes.

L'acide sulfureux augmente la perméabilité des membranes. C'est une constatation déjà ancienne que l'on a faite sur les cellules végétales et qui a même donné lieu à des applications pratiques, par exemple pour extraire le sucre des cossettes de betterave. Au cours de notre travail, nous n'avons jamais constaté un tel phénomène avec les *Acetobacter*. L'autolyse a été recherchée en dosant l'azote susceptible de diffuser dans le milieu au cours de l'incubation mais nous n'avons jamais pu la mettre en évidence.

Propriétés acides.

WYSS (92) applique à l'acide sulfureux une théorie déjà utilisée pour expliquer la différence de toxicité de l'ion et de la molécule du même corps. La membrane externe des bactéries ayant une structure lipidoprotéique, seules peuvent la franchir les molécules solubles dans les lipides. Or il se trouve, que les formes ionisées des acides habituellement utilisés comme inhibiteurs, sont insolubles dans les graisses alors que leurs molécules sont facilement solubles. Cette théorie, bien qu'elle n'explique pas le mode d'action de l'acide sulfureux, rend compte du fait qu'il n'est inhibiteur

qu'en milieu acide. Quoique cette explication ne soit pas à rejeter en général, elle ne peut s'appliquer à ce cas particulier. En effet, l'inhibition se produit dans les mêmes conditions si on utilise les bactéries ou les extraits dépourvus de cellules qui en dérivent. Elle n'est donc pas sous la dépendance de la perméabilité de la membrane, puisqu'elle n'existe plus dans les extraits.

Combinaison avec les aldéhydes.

On a longtemps cru que la découverte, par NEUBERG, de la fermentation déviée pouvait expliquer l'action inhibitrice de l'acide sulfureux. Dans le cas particulier des bactéries acétiques, la fermentation acétique serait bloquée parce que l'éthanal se transforme en éthane α hydroxysulfonate, que les bactéries ne peuvent plus oxyder. Comme on l'a vu, cet acide est dépourvu de toxicité pour les *Acetobacter* et il n'est donc pas possible d'expliquer par sa formation une inhibition totale. Dans la fermentation déviée de NEUBERG, seule une partie du phénomène, la transformation de l'éthanal en acide acétique, est inhibée. Si la réaction est suivie en mesurant l'absorption d'oxygène, on doit donc la trouver diminuée de moitié en présence de sulfite et l'inhibition doit cesser lorsque tout le sulfite est combiné.

Nos expériences montrent qu'il n'en est rien : l'inhibition peut être totale et l'acide éthane α hydroxysulfonique ne s'accumule pas dans le milieu sous l'action des bactéries inhibées.

Combinaison avec le DPN.

Depuis les travaux de PFLEIDERER, JECKEL et WIELAND (67) (68), on connaît l'action inhibitrice du sulfite sur les deshydrogénases à diphosphopyridine nucléotide. D'après ces auteurs, l'extrême sensibilité présentée par les deshydrogénases des acides malique et lactique, deux enzymes clefs du métabolisme intermédiaire, est susceptible de donner une explication aux propriétés désinfectantes bien connues de l'acide sulfureux. Nous avons donc examiné si la découverte de ces auteurs était susceptible de rendre compte du processus d'inhibition que nous avons décrit pour *Acetobacter*. L'inhibition des deshydrogénases se produit déjà à pH 7,2 et on ne mentionne pas une influence du pH. Pour les *Acetobacter* au contraire, le phénomène est presque nul à pH 7 et très exalté lorsque le pH diminue. L'acide sélénieux inhibe la respiration des *Acetobacter* à peu près dans les mêmes conditions que l'acide sulfureux alors qu'il est sans action sur la deshydrogénase de l'acide lactique. D'après les résultats de ces auteurs, les déshydrogénases sensibles à l'acide iodacétique ne sont pas sensibles au sulfite. Or on retrouve exactement le contraire pour *Acetobacter* qui est sensible à 2 mg/l d'esters de

l'acide monobromacétique, dont l'action est analogue à celle de l'acide monoiodacétique (35). Dans le cas de la déshydrogénase de l'acide lactique ces auteurs ont montré que le sulfite est un inhibiteur compétitif du lactate, alors que nos résultats montrent que pour *Acetobacter* il agit comme un inhibiteur absolu. Lorsqu'on met en incubation enzyme, coenzyme et sulfite, on voit apparaître une augmentation de l'absorption à 320 mμ en milieu neutre. Si la même chose s'était passée avec les *Acetobacter*, on aurait pu la déceler dans les spectres différentiels obtenus entre les bactéries incubées avec sulfite et sans sulfite. Nos résultats expérimentaux prouvent qu'il n'en est rien et que l'augmentation d'absorption ne se produit qu'en milieu acide et à 275 mμ. Ces deux inhibitions n'ont en commun qu'une seule propriété, c'est celle d'avoir une action réversible.

Toutes les différences que nous venons de relever montrent que le sulfite n'a pas le même comportement dans les deux cas.

Combinaison avec les fonctions thiols.

Après avoir passé en revue les diverses explications proposées pour rendre compte de l'action inhibitrice du sulfite, nous constatons qu'aucune d'elles n'est satisfaisante pour interpréter les résultats que nous avons obtenus avec *Acetobacter*. Au terme de cette étude, il nous paraît utile d'en proposer une nouvelle.

On remarque tout d'abord que les trois phénomènes qui ont été étudiés dans la partie expérimentale de ce travail :

inhibition par l'acide sulfureux de l'oxydation de l'éthanol,

fixation de l'acide sulfureux sur les corps bactériens,

combinaison de l'acide sulfureux avec les corps à fonction thiol, présentent des analogies frappantes.

En premier lieu nous avons montré qu'il s'agit là de réactions réversibles. L'inhibition cesse dans une proportion de 80 p. 100 lorsqu'on lave les bactéries ou qu'on relève le pH du milieu. L'acide sulfureux fixé sur es bactéries se comporte de la même façon. Quant à la combinaison avec la cystéine, elle est entièrement réversible. Le fait que la réversibilité ne soit pas totale avec les bactéries peut être interprété en admettant qu'une partie de l'acide sulfureux participe à une réaction différente de celle que nous avons décrite avec la cystéine.

En second lieu, le pH a la même influence sur ces réactions. L'inhibition étudiée augmente régulièrement lorsque le pH diminue et il en est de même de l'acide sulfureux fixé sur les bactéries. Nous avons vu que ces deux phénomènes ne sont proportionnels ni aux molécules SO_3H_2 ni aux ions SO_3H^-. Il semble plutôt que les ions bisulfites et les molécules y prennent part inégalement, les molécules réagissant plus

facilement que les ions. La combinaison avec la cystéine est aussi d'autant plus complète que le pH est plus bas.

Nous avons montré qu'une certaine quantité de sulfite peut se fixer sur les bactéries inactives, et elle varie peu avec le pH. Au contraire les bactéries ayant une activité enzymatique importante fixent beaucoup plus de sulfite en milieu acide qu'en milieu neutre. Cette constatation indique que l'intégrité du système enzymatique responsable de l'oxydation de l'éthanol est indispensable pour permettre la fixation du sulfite au pH bas. Les résultats obtenus avec des extraits enzymatiques étant identique à ceux obtenus avec des bactéries, on en a conclu que l'inhibition n'est pas liée à une question de perméabilité de membrane qui varierait avec le pH. Dans l'étude de l'inhibition, nous avons aussi observé que la quantité de sulfite à utiliser pour obtenir un résultat donné est à peu près proportionnelle à l'activité que l'on veut inhiber. Toutes ces raisons nous ont amené à penser que la fixation du sulfite se fait sur les molécules de protéines enzymatiques non altérées présentes dans les bactéries.

Or nous avons pu démontrer que le sulfite réagit en milieu acide sur les fonctions thiols pour donner un composé, qui à notre connaissance n'a pas été décrit jusqu'à ce jour et que nous avons des raisons de considérer comme un thiol ester de l'acide sulfureux. De nombreux travaux sur les enzymes et plus spécialement ceux de Barron et Levine (6) sur la deshydrogénase de l'éthanol, ont mis en évidence l'importance de certains groupes thiols qui sont indispensables à la fixation de la coenzyme comme à celle du substrat. L'inhibition peut donc s'expliquer par le blocage des fonctions thiols présentes sur les protéines enzymatiques, qui se produit à la suite de leur estérification par l'acide sulfureux. Cette explication de l'inhibition par les sulfites, qui ne paraît pas avoir déjà été proposée, nous semble être celle qui s'applique le mieux au cas particulier que nous avons étudié.

RÉSUMÉ

En introduction à ce travail, les réactions possibles du sulfite avec les fonctions thiols, et l'inhibition qu'il provoque de certaines réactions enzymatiques, ont été discutées.

Dans une première partie, on étudie, avec des bactéries non proliférantes par la méthode micromanométrique de Warburg, la réaction d'oxydation de l'éthanol en acide acétique. Elle est inhibée par l'acide sulfureux qui ne change pas la nature du produit de la réaction. La même inhibition se retrouve d'ailleurs lorsqu'on étudie l'oxydation de l'éthanal, du glucose et de l'acide lactique. L'influence du pH sur l'inhibition est importante, et on a cherché si le phénomène ne pouvait pas s'expliquer par la toxicité des molécules SO_3H_2 ou des ions SO_3H^-. La forme moléculaire est la plus active, mais autour de pH = 4, on doit aussi faire intervenir une certaine toxicité des ions bisulfites ;

les ions sulfites sont inactifs. Cette inhibition est très facilement réversible par les traitements suivants : lavage des bactéries, dilution de l'acide sulfureux, changement de pH et addition d'éthanal. L'étude cinétique de la réaction, en présence de concentrations différentes d'éthanol et d'acide sulfureux, montre que l'on est en présence d'une inhibition non compétitive. L'acide sulfureux se révèle donc comme un inhibiteur particulièrement efficace envers les bactéries acétiques, il paraît aussi pourvu de spécificité puisque la concentration à utiliser est proportionnelle à l'activité à inhiber.

Dans une deuxième partie, on montre qu'il existe une combinaison entre l'acide sulfureux et les systèmes enzymatiques des bactéries. En effet, les bactéries incubées en présence de sulfite radioactif fixent une partie importante de la radioactivité. C'est un phénomène qui est spécifique puisqu'on ne le retrouve pas avec le sulfate, même en milieu acide. On remarque aussi que les bactéries inactivées par la chaleur ou traitées par l'iode fixent moins de sulfite que les bactéries normales. Comme l'inhibition, la fixation de l'acide sulfureux est d'autant plus forte que le pH est plus bas. Ici aussi la radioactivité fixée sur les bactéries disparaît par un simple lavage. La combinaison de l'acide sulfureux n'est jamais complète, elle donne lieu à des équilibres où interviennent les concentrations en bactéries et en sulfite.

Une réaction modèle de la combinaison de l'acide sulfureux avec les fonctions thiols est étudiée dans la troisième partie. On montre par spectrophotométrie qu'il se forme un complexe, lorsqu'on mélange, en solution aqueuse, de l'acide sulfureux et un corps contenant une fonction sulfhydryle. Ce composé est étudié dans le cas particulier de la cystéine. Après avoir passé en revue les données concernant les spectres ultraviolets de la cystéine, de la cystine et de l'acide sulfureux, on montre que l'absorption des solutions acides de sulfite à 275 mμ est proportionnelle à la concentration en molécules non dissociées. Le complexe cysteine sulfite possède un maximum d'absorption à 267 mμ. Son étude faite par la méthode des variations continues montre que la combinaison se fait molécule à molécule. La constante d'équilibre de cette réaction a été déterminée, elle passe de 0,0022 à pH = 5,7 à 0,0013 à pH = 2,7. Cette réaction est instantanée et facilement réversible. Nous pensons que le produit formé est un thiolester de l'acide sulfureux, instable comme la plupart des esters de l'acide sulfureux.

Dans le cas qui nous intéresse, le sulfite n'agit pas par ses propriétés réductrices, puisque d'autres réducteurs comme la cystéine et l'acide ascorbique sont sans action sur cette réaction enzymatique. Il ne produit pas d'action lytique sur les cellules, car il n'a pas été possible de déceler des acides aminés dans le liquide où des bactéries ont été incubées en présence d'acide sulfureux. Le fait que l'inhibition se produise en milieu acide ne peut s'expliquer par une meilleure pénétration des molécules que des ions, puisque le même phénomène se produit avec les extraits enzymatiques. La combinaison de l'éthanal avec le bisulfite n'est pas à retenir puisqu'elle ne peut expliquer l'inhibition complète de la réaction étudiée. La combinaison du sulfite avec le DPN est inacceptable, car dans ce cas le sulfite est un inhibiteur compétitif avec le substrat, alors que nous avons trouvé qu'il agissait comme inhibiteur absolu. La réaction de Clarke dont l'optimum se situe en milieu neutre et qui donne naissance à un composé particulièrement stable, ne semble pas pouvoir expliquer cette inhibition facilement réversible et qui se produit principalement en milieu acide. On est donc amené à proposer une autre explication faisant appel à une réaction entre les groupements sulfhydryles du système enzymatique et

le sulfite. Il existe en effet, un parallélisme frappant en ce qui concerne la réversibilité et l'action du pH, entre les trois phénomènes étudiés : inhibition, combinaison de l'acide sulfureux avec les corps bactériens et formation d'un complexe avec la cystéine. Cette explication qui, à notre connaissance, n'avait jamais été proposée, s'appuie sur l'existence d'un complexe entre les groupements sulfhydryles et l'acide sulfureux.

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

(1) Alexander (P.) et Hudson (R.). — Wool its chemistry and physics. *Reinhold Pub. Corp.*, New York, 1954.

(2) Anon. — General results in the investigations showing the effect of sulphurous acid and sulphites upon digestion and health. *U. S. Dep. Agr. Bur. Chem. Circ.*, **37**, 1-18, 1907.

(3) Anson (M. L.). — Protein denaturation and the properties of protein groups. *Advances in Protein Chem.*, **2**, 361-86, 1945.

(4) Arbusow (A. E.). — Sur les éthers de l'acide sulfureux. *Bull. Soc. Chim.*, **8**, 890-891, 1910.

(5) Barltrop (J. A.), Hayes (P. M.) et Calvin (M.). — The chemistry of 1-2 dithiolane (trimethylene disulfide) as a model for the primary quantum conversion act in photosynthesis. *J. Am. Chem. Soc.*, **76**, 4348-4367, 1954.

(6) Barron (E. G. S.) et Levine (S.). — Oxidation of alcohols by yeast alcohol dehydrogenase and by the living celle. The Thiol groups of the Enzyme. *Arch. Biochem. Biophys.*, **41**, 175-187, 1952.

(7) Beaven (G.) et Holiday (E.). — Ultraviolet absorption spectra of proteins and amino acids. *Advances in Protein Chem.*, **7**, 320-386, 1952.

(8) Branch (G. E.) et Joslyn (M. A.). — The kinetics of the auto-oxidation of catechol in the presence of several foreign substances. *J. Am. Chem. Soc.*, **57**, 2388-2394, 1935.

(9) Buchner (E.) et Meisenheimer (J.). — Enzyme bei Spaltpilzgärungen. *Ber.*, **36**, 622-624, 1903.

(10) Buck (R. P.), Samang Singhadeja et Roger (L. B.). — Ultra-violet absorption spectra of some inorganic ions in aqueous solution. *Anal. Chem.*, **26**, 1240, 1954.

(11) Bunte (H.). — Ueber äthylaldehydschwefligsäure Salze und die Einwirkung des Schwefligsäuren Natrons auf Aethylidenchlorür. *Ann. Chem.*, **170**, 306-330, 1873.

(12) Calvin (M.). — Mercaptans and disulfides : some physics, chemistry, and speculation. *Glutathione*, Academic Press, New York, 3-26, 1954.

(13) Cecil (R.) et Lœning (U. E.). — The reaction of the disulphide bonds of insulin with sodium sulphite. *Biochem. J.*, **66**, 181, 1957.

(14) Cecil (R.) et Mc Phee (J. R.). — A kinetic study of the reaction on some disulphides with sodium sulphite. *Biochem. J.*, **60**, 496-506, 1955.

(15) Charlot (G.) et Gauguin (R.). — Analyse des réactions en solution. Masson et Cie. Paris, p. 39, 1951.

(16) Clarke (H. T.). — Sulfite action on cystine. *J. Biol. Chem.*, **97**, 235-250, 1932.

(17) Colowick (S.), Kaplan (N.), Ciotti (M.). — The reaction of pyridine nucleotide with cyanide and its analytical use. *J. Biol. Chem.*, **191**, 447-459, 1951.

(18) Cooper (P. D.). — Site of action of radiopenicillin. *Bacteriol. Rev.*, **20**, 28-46, 1956.

(19) CORDEBAR (J.). — L'oxydation chromique en analyse quantitative. *Sté Impr. Typogr.* Nancy, 1942.
(20) CRUESS (W. V.) and IRISH (H. J.). — Further observations on the relation of pH to toxicity of preservatives to micro organisms. *J. Bacteriol,* **23**, 163-166, 1932.
(21) DEIBNER (L.). — Particularités du dosage iodométrique de petites quantités d'anhydride sulfureux. *Ann. Techn. Agr.*, **3**, 207-242, 1953.
(22) DOGSON (K. S.), SPENCER (B.) et THOMAS (J.). — Studies on sulphatases. *Biochem. J.*, **53**, 452-7, 1953.
(23) DOWNER (A.). — The stability of ascorbic acid in citrus fruit juice products. *J. Am. Chem. Soc.*, **61**, 80-82, 1942.
(24) DUPUY (P.). — Les facteurs du développement de l'acescence dans le vin. *C. R. Ac. Agr. de France,* **41**, 269-72, 1954.
(25) ELSWORTH (F.) et PHILLIPS (H.). — The action of sulphites on the cystine disulfide linkages in wool. The influence of pH values on the reaction. *Biochem. J.* **32**, 837-843, 1938.
(26) ELSWORTH (F.) et PHILLIPS (H.). — The action of sulphites on the cystine disulfide linkages in wool. The influence of temperature, time and concentration on the reaction. *Biochem. J.*, **35**, 135-143, 1941.
(27) FRAENKEL-CONRAT (H.). — The essential groups of lysozyme with particular reference to its reaction with iodine. *Arch. Biochem. Biophys.*, **27**, 109, 1950.
(28) FRANZL (R.) et CHARGAFF (E.). — Bacterial enzyme preparations oxidizing inositol and their inhibition by colchicine. *Nature,* **166**, 955-957 1951.
(29) FRATEUR (J.). — Essai sur la systématique des *Acetobacter. La cellule,* **53**, 287-392, 1950.
(30) FREEDMANN (G.) et DONALD (G. M. S.). — Fermentation processes leading to glycerol. Studies on the effect of sulfites on viability, growth and fermentation of *Saccharomyces cerevisiae. Appl. Bact.*, **5**, 211-216, 1957.
(31) FROMAGEOT (P.) et CHAPEVILLE (F.). — Incorporation du sulfite dans l'animal supérieur. *La Biochimie du Soufre,* Éditions du C. N. R. S. Paris, 171-181, 1956.
(32) FROMAGEOT (C.) et HEITZ (P.). — Méthode de dosage spécifique de l'alanine et de la somme sérine + acide aspartique. *Microchim. Acta.*, **3**, 52-67, 1938.
(33) FROMAGEOT (C.) et SCHNEK (G.). — Le spectre ultra-violet du lysozyme avec des considérations sur le spectre ultra-violet de divers acides aminés et de quelques-uns de leurs peptides. *Biochim. Biophys. Acta.*, **6**, 113-122, 1950.
(34) GARRETT (C. S.). — Extinction measurements of solutions of sulphurous acid, sulphites, hydrogen sulphites and metabisulfites and of gaseous and liquid sulphur dioxide. *J. Chem. Soc.*, **107**, 1324, 1915.
(35) GILDO DAL CIN. — I derivati alogenati dell' acido acetico in enotecnia *Riv. Viti. e Enol.* (*Conegliano*), **3**, 357, 1950.
(36) GOMORI (G.). — Preparation of buffers for use in enzyme studies. *Methods in enzymology,* Academic Press, New York, **1**, 138, 1955.
(37) GRANT (M.). — Colorimetric determination of sulfur dioxide. *Anal. Chem.*, **19**, 3456, 1947.
(38) HANDLER (P.) et FRIDOVICH (I.). — Les dernières étapes de l'oxydation de la cystéine : l'oxydation du sulfite. *Biochimie du soufre,* Édition du C. N. R. S. Paris, 83-98, 1956.
(39) HASS (E.). — Notiz über das Verhalten der Absorption Spektren der Dihydro-pyridinverbindungen. *Biochem. Z.*, **288**, 123, 1936.
(40) HESTRIN (S.). — Fermentation of disaccharides. II. Sucrose. *Wallerstein Lab. Comm.*, **12**, 45-53, 1949.

(40 *bis*) Hromatka (O.). — Méthodes de recherches sur la fermentation avec la technique « cultures submergées ». *Cong. Int. du Vinaigre*, La Haye, 1957, communication n° 14.
(41) Hromatka (O.) et Ebner (H.). — Untersuchungen über die Essiggärung. I. Fesselgarung und Durchluftungsverfahren. *Enzymologia*, **13**, 369-387, 1949.
(42) Hromatka (O.), Ebner (H.) et Csoklich (C.). — Untersuchungen über die Essiggärung. IV. Uber den Einfluss einer vollständigen Unterbrechung der Belüftung auf die submerse Gärung. *Enzymologia*, **15**, 134-153, 1951.
(43) Ingram (M.) et Vas (K.). — Combination of sulphur dioxide with concentrated orange juice. I. Equilibrium states. *J. Sci. Food Agr.*, **1**, 21, 1950.
(44) Jacobsohn (K.) et Azevido (D.). — Étude sur la fermentation tartrique. *C. R. Soc. Biol.*, **149**, 1823-1825, 1955.
(45) Jaulmes (P.). — Analyses des vins. Poulain, Montpellier, 1951.
(46) Job (P.). — Formation et stabilité des complexes minéraux en solution. *Ann. de Chim.*, **9**, 113, 1928.
(47) Joslyn (M.). — Color retention in fruit products. *Ind. Eng. Chem.*, **33**, 308-314, 1941.
(48) Joslyn (M. A.) et Braverman (J. B. S.). — Sulfur dioxide treatment of fruit and vegetable products. *Advances in Food Research*, **5**, 97-160, 1954.
(49) Kerp (W.). — Die schwefelige Saure und ihre Verbindungen mit Aldehyden und Ketonen. *Arb. Ges. Amt.*, **21**, 175, 1904.
(50) King (T.) et Cheldelin (V.). — Oxidations in *Acetobacter suboxydans*. *Biochim. Biophys. Acta*, **14**, 108-116, 1954.
(51) King (T.) et Cheldelin (V.). — Oxidation of acetaldehyde by *Acetobacter suboxydans*. *J. Biol. Chem.*, **220**, 177-191, 1956.
(52) Kolthoff (I. M.) et Stricks (W.). — II. Reactions in ammoniacal medium in the presence and absence of sulfite. *J. Am. Chem. Soc.*, **73**, 1728-1333, 1951.
(52) Langmuir (I.). — The absorption of gases on plane surfaces of glass, mica and platinium. *J. Am. Chem. Soc.*, **40**, 1361-1403, 1918.
(54) Lineweaver (H.) et Burck (D.). — The determination of enzyme dissociation constants. *J. Am. Chem. Soc.*, **66**, 658-666, 1934.
(55) Lorenz (L.) et Samuel (R.). — Uber die Absorptions spektren von Schwefelverbindungen. *Z. phys. Chem. B.*, **14**, 219-231, 1931.
(56) Lubochinsky (B.) et Zalta (J. P.). — Microdosage colorimétrique de l'azote ammoniacal. *Bull. Soc. Chim. Biol.*, **36**, 1363-1366, 1954.
(57) Mac Phee (J. R.). — Further studies on the reaction of disulphides with sodium sulfite. *Biochem. J.*, **64**, 22-29, 1956.
(58) Meyerhof (O.), Ohlmeyer (P.) et Mohle (W.). — Uber die Koppelung zwischen Oxydoreduktion und Phosphatveresterung bei die anaeroben Kohlenhydratspaltung. *Biochem. Z.*, **297**, 113-134, 1938.
(59) Micheel (F.) et Bode (G.). — Zur Kenntnis der Schlangengifte. VI. Mitteil. *Ber.*, **71**, 1302-303, 1938.
(60) Micheel (F.) et Bode (G.). — Zur Kenntnis der Schlangengifte. VIII. Mitt. *Ber.*, **71**, 2653-2658, 1938.
(61) Micheel (F.) et Emde (H.). — Zur Kenntnis der Schlangengifte. *Z. f. physiol. Chem.*, **265**, 266-275, 1940.
(62) Miller (G. L.) et Du Vigneaud (V.). — The cystine content of insulin. *J. Biol. Chem.*, **118**, 101-110, 1937.
(63) Neuberg (C.) et Nord (F.). — Festlegung der Aldehydstufe bei der Essiggärung. *Biochem. Z.*, **96**, 158-174, 1919.
(64) Neuberg (C.) et Reinfurth (E.). — Die Festlegung der Aldehydstufe bei der alkoholischen Gärung. *Biochem. Z.*, **89**, 365-414, 1918.

(65) Pearson (P. B.). — Utilisation du soufre minéral par les animaux supérieurs pour la synthèse de molécules organiques. *La biochimie du Soufre*, Éditions du C. N. R. S. Paris, 153-170, 1956.
(66) Pechukas (A.). — Sulfite esters. *Chem. Abstracts*, **49**, 7588, 1955.
(67) Pfleiderer (G.), Jeckel (D.) et Wieland (T.). — Uber die Einwirkung von Sulfit auf einige DPN hydrierende Enzyme. *Biochem. Z.*, **328**, 187-194, 1956.
(68) Pfleiderer (G.), Jeckel (D.) et Wieland (T.). — Zum Wirkungsmechanismus der Milchsäure dehydrogenase. *Biochem. Z.*, **329**, 104-111, 1957.
(69) Rahn (O.) et Conn (J.). — Effect of increase in acidity on antiseptic efficiency. *Ind. Eng. Chem.*, **36**, 185-187, 1944.
(70) Rothenbach (F.) et Eberlin (L.). — Zu der Enzymgärung der Essigpilze. *Deutsche Essigindustrie Wochenschrift.*, **9**, 233, 1905.
(70 bis) Scardovi (V.). — Azione del solfito sull' attivazione enzimatica dell acido acetico in *Saccharomyces cerevisiae*. *Ann. di Microbiol.* **7**,, 30-7, 1956.
(71) Seifert (W.). — Uber die Einwirkung einiger antiseptisch Stoffe auf verschiedene Mikroorganismen des Weines. *Oesterreichische chemiker Zeitung*, **1**, 381-3, 1898.
(72) Simon (A.) et Waldmann (K.). — Uber die Konstitution der sauren Sulfit. I. Wässrige Disulfit — (Pyrosulfit) — Lösungen und ihr Verhalten in Abhängigkeit von Konzentration und Alkalisierungsgrad. *Z. für anor. all. Chem.*, **281**, 113-134, 1955.
(73) Simon (A.) et Waldmann (K.). — Uber die Konstitution der sauren Sulfit. II. Die Gleichgewichte der sauren Sulfit in wässrigen Lösungen auf Grund der Ramen-Spektren der in Wasser und in Methanol gelösten sowie der kristallisierten Alkalisalze. *Z. für anor. all. Chem.*, **281**, 135-150, 1955.
(74) Skeggs (H. R.) and Wright (L. D.). — Use of *Lactobacillus arabinosus* in the microbiological determination of pantothenic acid. *J. Biol. Chem.*, **156**, 21-26, 1944.
(75) Slotta (K. H.), Forster (W.), Ludwig (H.) et Conrat (F.). — Uber die schwefelhaltigen Bausteine des Cobra-Giftes. *Ber.*, **71**, 1623-1625, 1938.
(76) Smith (L.). — Bacterial cytochromes. *Bact. Rev.*, **18**, 106-130, 1954.
(77) Sorbo (B.). — *Biochimie du soufre*. Édition du C. N. R. S., Paris, p. 96, 1956.
(78) Speakman (P. T.). — The mechanism of the reaction between cystine in keratin and sulphite-bisulphite solutions at 50°C. *Biochim. Biophys. Acta*, **25**, 347-355, 1957 et **28**, 284-93, 1958.
(79) Stadtman (E. R.). — Préparation and assay of acyl coenzym A and other thiol esters. *Methods in enzymology* Academic Press New-York, **3**, 931-941, 1957.
(80) Stricks (W.) et Kolthoff (I. M.). — Equilibrium constants of the reaction of sulfite with cystine and with dithiodiglycolic acid. *J. Am. Chem. Soc.*, **73**, 4569-4574, 1951.
(81) Stricks (W.), Kolthoff (I. M.) et Kapoor (R. C.). — Equilibrium constants of the reaction between sulfite and oxydized glutathione. *J. Am. Chem. Soc.*, **77**, 2057-2061, 1955.
(82) Tartar (H. V.) et Garretson (H. H.). — The thermodynamic ionization constants of sulfurous acid at 25°. *J. Am. Chem. Soc.*, **63**, 808, 1941.
(83) Terayama (H.) et Vestling (C.). — Sodium sulfide inhibition of liver lactic dehydrogenase. *Biochim. Biophys. Acta*, **20**, 586-587, 1956.
(84) Underkofler (L. A.). — Industrial fermentations. *Chem. Pub. Corp. New York*, p. 257, 1954.

(85) VALYASHKO (N.) et CHESHKO (F.). — Spectographic study in the ultraviolet of sulfur dioxide and sulfurous acid methane sulfonic acids and their derivatives. *Sbornik. Statei. Obchcher. Kim. Akad. Nauk.* SSSR., **1**, 572-583, 1953.

(86) WALLENFELS (K.) et SCHULY (H.). — Uber den Mechanismus der Wasserstoffübertragung mit Pyridinucleotiden. VI. Die chemische Natur des Saureproduktes hydrierter Pyrimidium verbindungen und ein Vorschlag für einen Mechanismus der enzymatischen Reduktion von Brenztraubensäure und Phosphoglycerinsäure. *Biochem. Z.*, **329**, 75-82, 1957.

(87) WALLERSTEIN (J. S.) et STERN (K. G.). — Bisulfite as an inhibitor of carboxylase and the mechanism of glycerol fermentation. *J. Biol. Chem.*, **158**, 1-17, 1945.

(88) WARBURG (O.) et CHRISTIAN (W.). — Isolierung und Kristallisation des Gärungsferments Enolase. *Biochem. Z.*, **310**, 384-421, 1941.

(89) WIELAND (H.) et BERTHO (A.). — Uber den Mechanismus der Oxydations Vorgänge. *Ann. Chem.*, **467**, 95-158, 1928.

(90) WIELAND (T.) et KOPPE (H.). — Synthesen einiger weiterer S-Acylverbindungen insbesondere des Glutathions. *Ann. Chem.*, **588**, 15-24, 1954.

(91) WRIGHT (R.). — The absorption spectra of sulphurous acid and sulfites. *J. Chem. Soc.*, **105**, 2907, 1914.

(92) WYSS (O.). — Microbial inhibition by food preservatives. *Advance in Food Research*, **1**, 373-393, 1948.

(93) ZELICHT (I.). — α-hydroxysulfonate as inhibitors of the enzymatic oxydation of glycolic and lactic acids. *J. Biol. Chem.*, **224**, 251-260, 1957.

CONTRIBUTION A L'ÉTUDE DES MATIÈRES MINÉRALES DANS LES PRODUITS VÉGÉTAUX APPLICATION AU VIN

PAR

J. BONASTRE

Station Agronomique et Œnologique, Bordeaux.

PLAN DU MÉMOIRE

INTRODUCTION

PREMIÈRE PARTIE

MÉTHODES D'ANALYSE

Introduction

A) Historique.

1° Dosage des métaux alcalins.
2° Métaux alcalino-terreux.
3° Métaux lourds.

B) Méthodes étudiées.

1° Dosage des cations totaux.
2° Dosage des métaux alcalins.
3° Dosage des métaux alcalino-terreux.
4° Dosage des métaux lourds.

Étude des procédés de minéralisation.

a) échangeurs d'ions ;
b) Dosage colorimétrique du plomb. Mode opératoire.
c) Dosage polarographique simultané de plusieurs métaux lourds.
d) Dosage de l'aluminium. Mode opératoire.

Bibliographie.

DEUXIÈME PARTIE

RÉACTIONS D'ÉCHANGE D'IONS

A) Résines échangeuses d'ions.

1° Théorie succincte des réactions.
2° Évaluation et caractérisation des résines.
3° Courbes de titration des échangeurs.
4° La régénération saline mixte.

Étude de l'échange en fonction de la vitesse d'écoulement.

5° Conclusions.

B) Les ferrocyanures de métaux lourds.

I. — Observations sur la précipitation des ferrocyanures de métaux lourds.

1° Influence de la concentration des solutions.
2° Influence du temps de contact avec les eaux mères.
3° Remarques diverses.

II. — Décomposition des sels par les bases.

Cas des ferrocyanures.
Cas du ferrocyanure ferrique.

III. — Mesures physiques sur les ferrocyanures de métaux lourds.

— Spectres de rayons X.
— Étude thermogravimétrique.

IV. — Réactions de déplacement de cations.

a) Expériences qualitatives.
b) Expériences quantitatives.

V. — Emploi du ferrocyanure ferrique en phase fixe.

1° Les célites.
2° Réactions de déplacement de cations.

TROISIÈME PARTIE

APPLICATIONS ŒNOLOGIQUES

Introduction.

I. — Étude du plomb dans les vins.

A) Teneur moyenne des moûts — Influence de la fermentation.
B) Enrichissement au cours du stockage. Essai sur des solutions synthétiques. Conclusions.

II. — Emploi des échangeurs d'ions pour le traitement des vins.

A) Résines échangeuses d'ions.
1. Formes possibles du traitement.
2. Non efficacité des échangeurs carboxyliques. Emploi sous forme sodique.
3. La régénération saline mixte.
B) Utilisation du ferrocyanure ferrique.

III. — Documents analytiques.

A) Bilans de cations effectués sur quelques vins de provenance authentique.
B) Évolution des matières minérales du raisin au cours de la maturation.

Résumé et conclusions.

Bibliographie.

INTRODUCTION

Si l'étude des méthodes de dosage des substances organiques dans les produits biologiques et naturels a pris une grande importance, par contre le dosage des ions minéraux est demeuré en retard. En œnologie, les procédés employés dans les laboratoires de contrôle donnent le plus souvent une précision bien suffisante pour les besoins de la pratique ou la recherche des falsifications. Cependant, pour l'établissement des bilans complets des cations minéraux, il est nécessaire de disposer de méthodes analytiques plus précises et dans la mesure du possible suffisamment rapides pour permettre l'examen d'un grand nombre d'échantillons ; ceci nous a conduit à étudier le dosage des ions alcalins et alcalino-terreux. D'autre part, pour des raisons aussi bien de chimie analytique pure que d'hygiène alimentaire, nous nous sommes penchés sur le problème du microdosage des métaux lourds. Toutes ces méthodes sont d'emploi général, mais nous avons surtout envisagé leur application à l'analyse des vins.

Enfin, comme certains cations sont parfois indésirables dans le vin, il faut connaître les procédés susceptibles de les éliminer sans altérer les propriétés organoleptiques et sans danger pour le consommateur. Nous avons ainsi été amenés à examiner certaines propriétés des résines échangeuses d'ions, qui, par une utilisation convenable, permettent la stabilisation du vin vis-à-vis des précipitations tartriques. L'élimination quasi-totale des métaux lourds pose un problème différent : il s'agit de trouver un échangeur sélectif et satisfaisant. Nous pensons que le ferrocyanure ferrique remplit bien ces conditions.

Ce travail comprendra trois parties principales :

I. — Étude et discussion de méthodes analytiques.

II. — Étude de réactions d'échange d'ions.

III. — Applications œnologiques.

PREMIÈRE PARTIE

MÉTHODES D'ANALYSE

Après un bref rappel des méthodes couramment utilisées, nous exposerons le résultat des recherches entreprises dans le double but d'accroître la précision et la sensibilité des dosages et d'en augmenter la rapidité autant qu'il est possible. Ces deux points sont conciliables par l'utilisation des procédés physicochimiques, qui présentent le plus souvent une spécificité et une sensibilité supérieures à celles des méthodes classiques.

A. — HISTORIQUE

1. DOSAGE DES MÉTAUX ALCALINS

a) **Potassium.** — Ce métal est le plus répandu dans les produits végétaux et il constitue à lui seul les trois-quarts des cations totaux du vin. On le dose le plus souvent en mettant à profit l'insolubilité du bitartrate en présence d'alcool (Procédés Berthelot-de Fleurieu, Pasteur-Reboul). Ces deux procédés sont longs et peu précis ; on observe des erreurs en plus ou en moins par rapport à la quantité réelle de potassium. L'importance et le signe de l'erreur sont fonction, de manière très complexe, de la teneur du vin en calcium, sodium et acide phosphorique. Des essais systématiques nous ont permis de penser que de grandes quantités de calcium faussent le dosage par excès, avec précipitation de tartrate de calcium. Dans les vins riches en sodium, les résultats sont très souvent faibles. Enfin, la présence simultanée de beaucoup de calcium et d'acide phosphorique conduit à la précipitation de phosphate acide de calcium, qui lors du dosage acidimétrique final, est compté comme bitartrate. Comme méthodes plus précises, on a proposé la précipitation sous forme de perchlorate (Kling et Lassieur (1), Semichon, Flanzy et Lamazou-Betbeder (2)) ou de cobaltinitrite (Garola et Braun (3), Leulier, Velluz et Griffon (4), Leulier (5), Vanhems (6)). Les résultats sont très bons, mais leur emploi demande beaucoup de temps.

b) **Sodium.** — Le dosage en est difficile ; on précipite cet ion sous forme d'un complexe triple magnésien-acéto-uranylique (sel de STRENG), (qu'on évalue ensuite par pesée ou par volumétrie ou colorimétrie de l'ion UO_2^{--}).

2. MÉTAUX ALCALINO-TERREUX

On emploie les méthodes courantes : incinération de 100 ml, puis dosage du calcium par l'oxalate, du magnésium sous forme de phosphate ammoniaco-magnésien. Parfois on n'effectue que le dosage du calcium : on précipite alors cet élément sans incinération préalable. Nous verrons qu'on peut ainsi commettre des erreurs assez importantes. La technique semi-micro (7) est assez compliquée.

3. MÉTAUX LOURDS

a) **Cuivre.** — On peut évaluer très grossièrement la teneur en cuivre du vin en y ajoutant quelques gouttes d'une solution de sulfure de sodium (8). On compare à une série de vins-étalons.

On peut faire un dosage très précis par électrolyse après séparation sous forme de sulfure. A l'échelle semi-micro, le cuivre séparé par électrolyse peut être évalué par colorimétrie, au moyen par exemple du diéthyl-dithio-carbamate (9). Actuellement, la colorimétrie du complexe avec le 2-2-diquinolyle est très employée en raison de sa spécificité presque absolue (10 et 11).

b) **Fer.** — On peut doser Fe^{3+} par le sulfocyanure (12) ou bien Fe^{2+} par l'ortho-phénanthroline. Volumétriquement, le dosage par l'EDTA (éthylène-diamine-tétracétate disodique) à pH3, en présence d'acide sulfosalicylique donne de très bons résultats.

c) **Zinc.** — NEY (13) a décrit un dosage bromatométrique indirect, après précipitation du métal par la 8-hydroxyquinoléine. On peut également le précipiter à l'état de sulfure à pH contrôlé et doser ensuite sous forme de ZnO. Ces procédés sont insuffisants pour l'appréciation de la teneur normale en zinc ; ils ne conviennent que pour les fortes contaminations.

Le zinc « normal » peut être évalué par la dithizone (14-15-16) ou le complexe rhodamine B-sulfocyanure (17).

d) **Manganèse.** — Le meilleur procédé est basé sur la transformation de Mn^{2+} en MnO_4^- qu'on évalue par colorimétrie.

e) **Plomb.** — On le dose surtout par la dithizone. Nous reviendrons plus loin sur ce dosage, qui présente actuellement une grande importance.

f) **Aluminium.** — Très difficile à doser dans les milieux contenant du fer, cet élément s'évalue en général par différence (18) ; on précipite la totalité des oxydes Me_2O_3 et, après dosage du fer, on calcule la teneur en Al avec la formule

$$Al_{mg/l} = \left(P - \frac{Fe}{0{,}6994}\right) 0{,}52914$$

où P est le poids total des oxydes Me_2O_3 et Fe la teneur en fer, exprimés en mg/l.

La détection colorimétrique (aluminon (19), rouge d'alizarine (20), bleu au chrome N (21) se prête assez mal à une évaluation quantitative.

B. — MÉTHODES ÉTUDIÉES

Dans la recherche de nouvelles méthodes, nous n'avons tenu compte des éléments gênants que dans la mesure où ils sont susceptibles d'exister en quantité non négligeable dans les milieux biologiques. C'est ainsi que, dans le dosage du calcium, on n'a pas cherché à éliminer le baryum ou le strontium, qui ne se rencontrent pas dans les sucs végétaux.

1. DOSAGE DES CATIONS TOTAUX

Cette notion n'a, à notre connaissance, jamais été dégagée de manière explicite en ce qui concerne l'analyse des vins. Le dosage des cations totaux est très utile pour contrôler les bilans.

Anticipant sur le chapitre suivant, nous dirons simplement que la réaction d'un échangeur de cation $R.SO_3H$ avec un sel permet la libération d'une quantité d'ions H^+ stœchiométriquement équivalente à la quantité de cations du sel, suivant la réaction

$$R \cdot SO_3H + Na^+ \underset{b}{\overset{a}{\rightleftharpoons}} R \cdot SO_3Na + H^+$$

En employant un gros excès d'échangeur et en entraînant la solution au travers de l'échangeur, on peut rendre la réaction quantitative dans le sens (*a*) ; une solution acide contenant des sels voit, après passage sur l'échangeur, son acidité augmenter d'une quantité Δn, qui correspond exactement aux cations qui étaient salifiés.

Mode opératoire.

On place dans une burette ordinaire 5 à 6 grammes de résine DOWEX 50 sous forme acide. Après lavage, on fait passer 10 ml de vin à raison d'une goutte toutes les deux secondes. On recueille le vin traité, rince trois fois avec 10 ml d'eau en recueillant l'eau de rinçage. On dose l'aci-

dité totale, soit n' ml d'alcali N/10. On dose de même l'acidité totale du vin non traité, soit n ml d'alcali N/10 ; on a : $n' - n = \Delta n$.

La quantité totale de cations, en milliéquivalents par litre est : $10\ \Delta n$.

Des essais nombreux ont montré la parfaite reproductibilité des résultats ; on a obtenu une excellente concordance avec de nombreux bilans.

Évaluation des anions minéraux.

L'alcalinité des cendres d'un vin représente la teneur en anions organiques salifiés, ceux-ci donnant au cours de la calcination des carbonates ; l'alcalinité des cendres constitue justement le dosage de ces carbonates, soit A méq/l.

Les anions minéraux sont entièrement salifiés dans les cendres. Donc la différence

$$10\ \Delta n - A$$

représente les cations combinés aux anions minéraux ou bien encore ces anions eux-mêmes. Cette évaluation permet de connaître à 5 p. 100 près la teneur en anions minéraux, l'imprécision étant surtout due à l'erreur causée par la présence des phosphates lors de la détermination de l'alcalinité des cendres.

2. DOSAGE DES MÉTAUX ALCALINS

Photométrie de flamme.

La spectrophotométrie de la flamme est devenue d'usage courant pour le dosage de ces métaux. En bromatologie, de nombreux travaux ont été publiés (22-23-24).

En raison de la facilité d'excitation thermique des ions alcalins et de l'intensité des raies produites, on peut employer une source thermique assez froide (800°C) ; on élimine ainsi les interférences dues aux autres cations. L'intensité de l'émission spectrale se mesure très facilement par un dispositif photoélectrique au sélénium et un galvanomètre sensible. Pour isoler la raie caractéristique de l'alcalin qu'on veut doser, on peut utiliser comme monochromateurs des étalons Pérot et Fabry à lames semi-argentées.

Les points délicats de la méthode sont :

a) La stabilité parfaite du régime de combustion du brûleur, qu'on obtient par régulation des fluides (gaz de ville et nébulisat de la solution).

b) La stabilité du circuit de mesure.

L'appareil mis à notre disposition a été entièrement reconstruit par nos soins ; pour obtenir des lectures stables sur le cadran du galva-

nomètre, nous avons dû, en particulier, le shunter par un condensateur de forte valeur, pour que sa période d'oscillation propre soit grande devant les irrégularités, rapides mais non périodiques, dues à la pulvérisation de l'échantillon. On réalise ainsi un véritable circuit intégrateur, qui donne la valeur moyenne du courant photo-électrique avec une reproductibilité de l'ordre de ± 0,5 p. 100.

Dans ces conditions, et compte tenu de toutes les causes d'erreur pouvant intervenir, on peut doser avec l'appareil ainsi modifié :

de 2 à 2 000 mg/litre de potassium,

de 0,5 à 1 000 mg/litre de sodium,

avec une erreur relative de ± 2 p. 100.

Dans le cas des vins, on dose les deux ions alcalins sur le produit dilué dix fois. Il n'est pas nécessaire de minéraliser l'échantillon, car, à cette dilution, le fond continu de la flamme n'interfère pas en raison de la bonne qualité des monochromateurs.

Emploi du tétraphénylborate de sodium.

En l'absence d'ammonium, ce réactif est spécifique du potassium. Il donne avec cet ion un précipité bien cristallisé, soluble dans l'acétone et insoluble dans l'eau.

Le précipité peut être évalué par gravimétrie (25-26) ou volumétrie (27). Ce dernier mode de dosage est extrêmement rapide et permet un travail à l'échelle semi-micro.

Nous avons déjà décrit la technique de précipitation et de dosage (28) ; une étude comparative des divers procédés de dosage du potassium nous permet de penser que ce nouveau réactif est le meilleur de tous ceux qui ont été jusqu'ici proposés pour doser le potassium.

3. DOSAGE DES MÉTAUX ALCALINO-TERREUX

Comme on dose rarement le magnésium, le calcium est le plus souvent précipité dans le vin lui-même sous forme d'oxalate. On néglige l'incinération des 100 ml nécessaires, à cause des difficultés que présente cette opération. Cependant, une telle manière d'opérer est défectueuse pour les raisons suivantes :

a) La présence de matières organiques colloïdales rend très difficile la filtration du précipité.

b) L'oxalate de calcium adsorbe fortement les tanins, colorants, etc ; il est difficile de les éliminer lors du lavage et, au cours du dosage final par le permanganate, ces substances sont elles-mêmes oxydées, et les erreurs par excès ainsi introduites peuvent représenter jusqu'à

10 p. 100. Dans ces conditions, ce procédé est inadmissible pour l'établissement d'un bilan exact, bien que, dans la pratique courante, l'ordre de grandeur soit suffisant. Le dosage en semi-micro est délicat et fort long.

Les remarques suivantes nous ont permis de mettre au point deux méthodes de dosage.

a) Un échangeur de cations acide fixe *quantitativement* les cations d'une solution ; on peut les éluer *quantitativement* au moyen d'un acide.

b) Un échangeur d'anions sous forme citrique donne avec les métaux lourds des complexes très stables ; ils sont donc fixés *quantitativement*. Le même échangeur ne fixe pas les cations alcalino-terreux (29-30).

D'où les deux méthodes de dosage.

a) On traite 100 ml de la solution contenant les cations à doser par une colonne de résine DOWEX 50 acide ; la vitesse de passage du liquide peut être portée à 1 goutte $(cm^2)^{-1}$ sec^{-1} (1). On rince à l'eau distillée et élue, à la même vitesse, par 100 ml d'HCl 2 N environ. On dose ensuite calcium et magnésium par les méthodes classiques ; l'opération a pour but l'élimination complète de toutes les substances organiques.

b) *Semi-microdosage.*

On prépare une colonne de 10 g de DOWEX 50 en cycle acide et une autre colonne de 10 g de DOWEX 2 ou d'AMBERLITE IRA 400 (échangeurs d'anions, bases fortes). Cette dernière est traitée par 50 ml d'HCl N, rincée, traitée ensuite par 100 ml d'acide citrique 3 N puis rincée à nouveau jusqu'à neutralité.

L'échantillon (20 ml) est d'abord passé sur la première colonne, qu'on élue après rinçage par 30 ml d'HCl 2 N On évapore cet éluat à sec, reprend par l'eau. Cette solution passe alors sur la deuxième colonne, à la vitesse de 10 gouttes $(cm^2)^{-1}$ $(min)^{-1}$. On recueille le liquide et l'eau de rinçage de la colonne ; on complète à 200 ml. Cette solution ne contient, comme cations, que les alcalins et les alcalino-terreux. Dans le cas des vins, le ballon de 200 ml renferme 2 mg de chacun de ces deux derniers cations.

On peut les doser au moyen d'une solution M/100 d'EDTA suivant la technique de SCHWARZENBACH (31) :

— sur 100 ml, on dose le calcium en présence de murexide, soit n ml de réactif versés,

— sur 50 ml on dose la somme Ca + Mg en présence de noir Eriochrome T, soit n' ml.

La teneur en magnésium est donnée par $(2\,n' - n)$ ml. 1 ml d'EDTA M/100 correspond à 0,4008 mg de calcium ou à 0,2432 mg de magnésium.

Même avec un réactif aussi dilué, les virages sont extrêmement nets en raison de l'absence complète de métaux lourds.

(1) Une goutte par cm^2 de surface de la colonne et par seconde.

4. DOSAGE DES MÉTAUX LOURDS

a) Étude des procédés de minéralisation.

Le dosage précis des métaux lourds nécessite toujours une minéralisation ; les soins apportés à cette partie de l'opération influent fortement sur le résultat final.

On peut envisager a priori l'emploi d'un échangeur de cations comme il a été vu précédemment. En fait, la teneur en Pb, Zn etc. étant de 100 à 1 000 fois moins forte que la teneur en calcium, il faut tenir compte des impuretés des réactifs. L'eau distillée ordinaire et les produits chimiques, même « Pour Analyses » renferment trop de métaux lourds pour être utilisés directement; toutes ces impuretés sont concentrées dans l'échangeur et restituées à la solution sur laquelle on fait le dosage final. Leur purification par double distillation est peu pratique en raison des quantités utilisées.

Minéralisation par voie sèche.

L'incinération doit se faire sans perte et surtout sans gain de matières étrangères :

α) *Pertes de matière.* — Les pertes par *projection* sont fréquentes dans les produits contenant beaucoup de matières organiques (sang, vins sucrés, moûts). Elles peuvent être évitées par un chauffage très lent (3 à 12 heures par exemple pour 50 ml de vin, selon la teneur en sucre). Les pertes par volatilisation ont fait l'objet d'une étude très détaillée (32). On peut, d'après les conclusions de ces auteurs, et nos propres essais, admettre qu'à 450°, même pendant plusieurs heures, le zinc et le manganèse ne se volatilisent pas.

β) *Enrichissements.* — Il est indispensable d'opérer dans un four électrique, si possible avec un moufle en silice. Les capsules, minutieusement nettoyées, doivent être en silice transparente. Nous évitons l'emploi du platine pour la raison suivante : dans le cas de produits contenant du fer (et c'est la généralité des produits végétaux ou animaux), le chauffage dans le platine conduit dès 450° à la formation d'un complexe Fe-Pt, qui se dissout lorsqu'on reprend les cendres par un acide. Le platine ainsi solubilisé gêne beaucoup les dosages polarographiques, sa vague apparaissant dès 0 volt.

Minéralisation par voie humide.

Indispensable pour le dosage des éléments tels que l'arsenic, ce procédé est excellent dans tous les cas, surtout pour l'analyse de produits solides.

En raison de la basse température d'attaque, les parois du récipient où l'on travaille ne réagissent pas avec l'acide nitrique. En contrepartie,

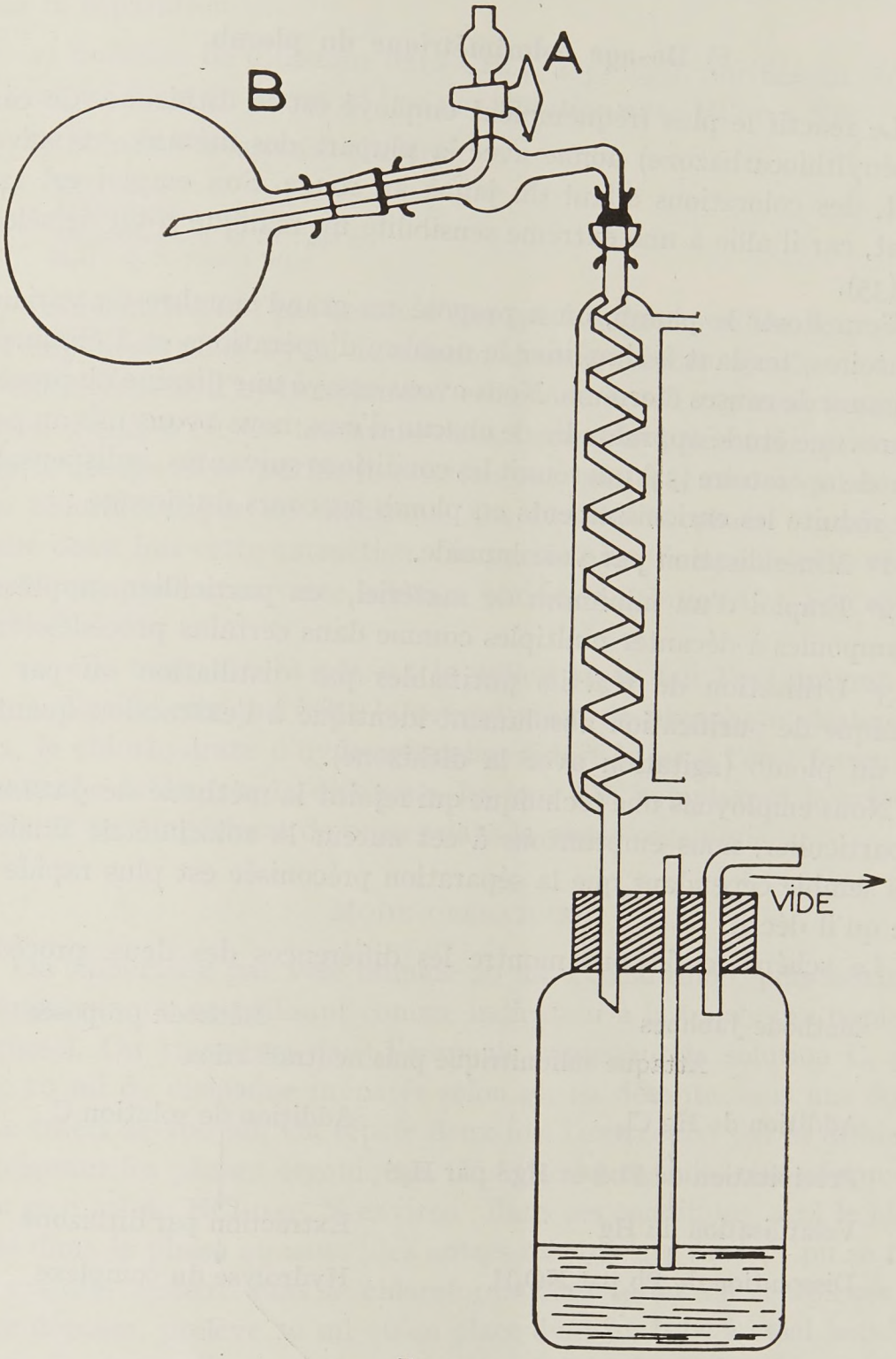


FIG. 1.

il faut avoir des acides rigoureusement purs : on les distille facilement avec le matériel décrit par JAULMES (33).

Nous avons mis au point un appareil (fig. 1) qui permet d'éviter l'emploi d'une hotte (34). Le schéma ne demande pas de commentaire.

Nous avons constaté que cet appareil, d'emploi très commode, permet des destructions plus rapides tout en exigeant moins d'acide nitrique que le ballon ouvert généralement utilisé.

b) Dosage colorimétrique du plomb.

Le réactif le plus fréquemment employé est la dithizone. Ce corps (diphénylthiocarbazone) donne avec la plupart des métaux, et suivant le pH, des colorations allant du jaune au rouge. Son emploi est assez délicat, car il allie à une extrême sensibilité un manque total de sélectivité (35).

Pour doser le plomb, on a proposé un grand nombre de variantes opératoires, tendant à simplifier le nombre d'opérations et à éliminer le maximum de causes d'erreurs. Nous avons essayé une dizaine de procédés et après une étude approfondie de chacun d'eux, nous avons mis au point un mode opératoire (34) qui réunit les conditions suivantes, indispensables pour réduire les enrichissements en plomb au cours du dosage :

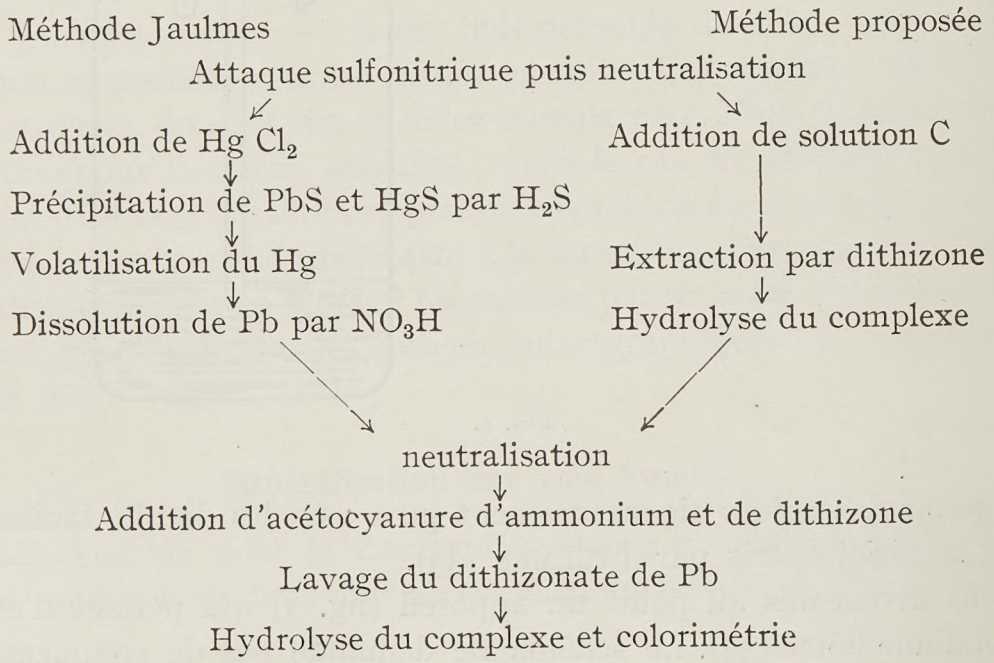
1° Minéralisation par voie humide.

2° Emploi d'un minimum de matériel, en particulier suppression des ampoules à décanter multiples comme dans certains procédés.

3° Utilisation de réactifs purifiables par distillation ou par une technique de purification absolument identique à l'extraction quantitative du plomb (agitation avec la dithizone).

Nous employons une technique qui rejoint la méthode de JAULMES ; en particulier, nous empruntons à cet auteur la colorimétrie finale ; il nous semble cependant que la séparation préconisée est plus rapide que celle qu'il décrit.

Le schéma ci-dessous montre les différences des deux procédés :



JAULMES (33) décrit la distillation des acides nécessaires pour l'attaque, et la fabrication de l'acétocyanure d'ammonium. Nous n'indiquerons que la préparation de la solution C et du réactif à la dithizone utilisé pour la séparation.

a) Solution de dithizone dans $CHCl_3$ à 30 mg/l, purifiée au moment de l'emploi dans un flacon ad hoc par agitation avec HCl 0,5 N.

b) Solution cyanurée citrique :

KCN : 20 g
Acide citrique : 10 g
Ammoniaque à 22 Bé : 500 ml
H_2O : Q. S. pour 1 litre.

Ces réactifs n'ont pas besoin d'être spécialement purifiés. Au moment de l'emploi, on place 15 ml de solution dans un bécher, ajoute 0,2 à 0,3 g de chlorhydrate d'hydroxylamine et amène à pH 9,5 exactement au moyen d'HCl 6 N. On transvase dans l'ampoule à décanter qui servira pour le dosage et on purifie la solution par agitation avec 20 ml de solution chloroformique de dithizone. On décante la phase organique et répète deux fois cette extraction. On purifie ainsi l'ampoule et le réactif.

Nous appellerons cette solution purifiée « Solution C ». Son rôle est double :

— elle tamponne à pH 9,5 le milieu où se fait l'extraction,

— l'acide citrique évite la précipitation de phosphate alcalino-terreux, le chlorhydrate d'hydroxylamine réduit le fer à l'état ferreux qui n'a aucune action sur la dithizone, les ions CN^- complexent le cuivre et le zinc et les empêchent de passer dans la phase organique.

MODE OPÉRATOIRE

On minéralise par voie humide 20 ml d'échantillon, puis neutralise à l'ammoniaque en utilisant comme indicateur à la touche un papier de tournesol. On transvase dans l'ampoule contenant la solution C, agite avec 10 ml de dithizone préparée selon *a*), on décante dans une éprouvette émeri de 100 ml. On répète deux fois l'extraction par la dithizone, en joignant les phases organiques. On agite les extraits chloroformiques avec 20,0 ml de HCl 0,05 N environ ; dans ces conditions, seul le plomb passe dans la phase aqueuse ; les autres métaux qui avaient pu se trouver extraits restent dans le chloroforme sous forme de complexes. On laisse déposer, prélève 10 ml qu'on place dans un tube à essai bouchant émeri. On neutralise avec la quantité calculée de NH_4OH ; on ajoute 5 ml d'acétocyanure d'ammonium (voir technique Jaulmes), 1 ml de CCl_4 distillé puis 2 ml de solution aqueuse de dithizone (également technique de Jaulmes). On opère de même avec des tubes contenant des quantités connues de plomb, allant de 0 à 3 gamma. On agite, laisse déposer, siphonne la phase aqueuse ; on rince avec quelques ml d'eau puis à 2-3

reprises avec l'acétocyanure d'ammonium dilué au 1/50e pour éliminer la dithizone non combinée. La couche organique est colorée en rouge, et on peut effectuer la colorimétrie ; mais il vaut mieux utiliser la coloration verte de la dithizone à cause de la sensibilité chromatique de l'œil. On ajoute donc à chaque tube 5 gouttes de HCl 2N, ce qui libère la dithizone, et fait virer au vert la coloration. On peut utiliser la méthode entre 0,1 et 3 gamma dans la prise d'essai ; on apprécie 0,25 gamma de différence entre deux tubes sans employer de colorimètre. La purification soigneuse des réactifs permet de réduire le « blanc » à 0,02 gamma au grand maximum, et il est possible d'avoir des « blancs » exempts de plomb.

Le nettoyage de tout le matériel utilisé se fait par ébullition dans l'acide nitrique concentré, ou bien par lavage à chaud avec une solution d'EDTA à pH 8-9, contenant 100 g d'acide EDTA par litre. Par mesure de prudence, il vaut mieux effectuer un tel nettoyage avant chaque dosage.

c) Dosage polarographique simultané de plusieurs métaux lourds.

L'intérêt des procédés polarographiques réside en ce que les séparations peuvent être réduites au maximum ; il est en effet très souvent possible de trouver des électrolytes indifférents permettant aux divers ions de se réduire à des potentiels différents.

Sans rappeler les principes de la polarographie, nous retiendrons qu'en dernière analyse l'intensité du courant limite de diffusion est proportionnel à la concentration en ion réductible : si on se place dans les conditions requises on a $i_d = KC$.

Il est en particulier nécessaire que la solution à polarographier contienne un électrolyte non réductible dans les conditions de l'expérience, à une concentration au moins dix fois supérieure à celle de l'ion envisagé.

La recherche d'une technique polarographique de dosage consiste à trouver un électrolyte indifférent dans lequel l'ion à doser ne donne pas, autant que possible, un maximum. La vague formée doit être proche de la réversibilité et on doit complexer, sinon éliminer les ions dont le potentiel de demi-palier précède celui de l'ion que l'on dose. En effet, des ions à trop forte concentration peuvent donner, avant l'ion réductible, un courant de diffusion important, dont l'existence est matériellement incompatible avec les fortes sensibilités nécessaires pour le dosage de traces.

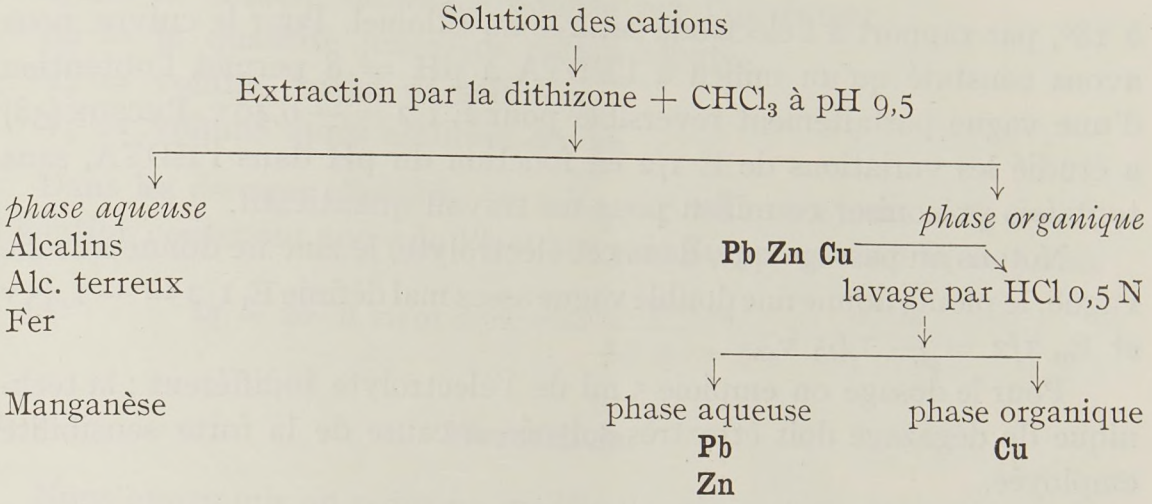
Dosage du plomb, du zinc et du cuivre.

Dans les milieux biologiques, il y a très souvent du fer ; ce métal existe, dans les vins, à des doses 10 à 100 fois supérieures à celles des trois métaux étudiés ; comme l'ion Fe^{+++} se réduit à 0 volt (par rapport

à l'électrode au calomel saturée) son courant de diffusion très considérable est une gêne. Nous avons donc été conduits à séparer chimiquement cet élément.

Dans une solution de métaux lourds, en l'absence de cyanure et à pH voisin de 9,5, nous pouvons extraire les cations Cu^{++}, Pb^{++} et Zn^{++} et les séparer ainsi du fer. A pH 2, on fait passer Pb^{++} et Zn^{++} en solution aqueuse, le cuivre restant complexé.

On obtiendra donc des solutions contenant d'une part Zn^{++} et Pb^{++} d'autre part Cu^{++} ; ce mode opératoire pourra être schématisé comme suit.



Technique

a) On minéralise 20 ml d'échantillon, par l'une des deux méthodes décrites.

b) Dans une ampoule à décanter, on place 50 ml d'eau, 5 ml d'acide citrique 3 N, on amène à pH 9,5 avec de l'ammoniaque. On lave à 3 reprises avec une solution à 0,03 p. 100 de dithizone dans le chloroforme, préparée comme il a été dit pour le dosage colorimétrique du plomb.

c) Dans cette solution purifiée, on verse la solution neutralisée du résidu minéral de l'échantillon. On extrait à 3 reprises par 5 ml de solution de dithizone, en recueillant chaque fois les phases organiques dans une ampoule à décanter.

d) Les extraits chloroformiques sont agités trois fois avec 5 ml d'acide chlorhydrique 0,5 N, en rassemblant les 3 extraits aqueux dans un bécher de 30 ml.

e) On évapore à sec la phase aqueuse ; la phase organique est recueillie dans un creuset de silice et évaporée soigneusement. On calcine ensuite très doucement, ajoute une goutte de NO_3H pur et évapore à sec.

Après un grand nombre d'essais, on a trouvé un milieu se prêtant au dosage simultané du plomb et du zinc. Il est composé comme suit :

acétate d'ammonium	0,1 N
sulfocyanure d'ammonium	0,03 N

tamponné par l'acide acétique à pH 4,6.

Cet électrolyte indifférent est voisin de celui préconisé par STOUT (37) pour le dosage du zinc seul.

On a mesuré :

$$E/1/2\ Pb = -0{,}46\ v$$
$$E/1/2\ Zn = -1{,}06\ v$$

à 18°, par rapport à l'électrode saturée au calomel. Pour le cuivre, nous avons constaté qu'un milieu à l'EDTA à pH = 8 permet l'obtention d'une vague parfaitement réversible pour E 1/2 = — 0,40 v. PECSOK (38) a étudié les variations de E 1/2 en fonction du pH dans l'EDTA, sans toutefois préconiser ce milieu pour un travail quantitatif.

Notons au passage que, dans cet électrolyte, le zinc ne donne aucune vague, le plomb donne une double vague assez mal définie E_{I} 1/2 = — 1,45 v et E_{II} 1/2 = — 1,65 v.

Pour le dosage on emploie 5 ml de l'électrolyte indifférent ; la technique de dégazage doit être très soignée, à cause de la forte sensibilité employée.

Manganèse.

Cet élément ne peut être dosé qu'en milieu alcalin étant donné son potentiel très négatif de réduction. On peut opérer en présence de nombreux ions, à condition de les complexer par le cyanure. Le milieu mis au point contient des ions citrate évitant toute précipitation d'ions alcalino terreux. Pour éviter tout maximum, nous opérons en présence de gélatine comme suppresseur.

Dans le milieu

0,3 M/l cyanure de K.
0,1 M/l acide citrique.
5 M/l NH_4OH.

le potentiel $E_{1/2}$ = — 1,36 volt.

Dans le cas des vins, les cendres de 20 ml sont dissoutes dans 1 ml de HCl 6 N ; on évapore à sec, on reprend par 5 ml de l'électrolyte ci-dessus, auquel on ajoute 1 goutte de gélatine à 0,5 p. 100.

Nous avons utilisé un polarographe Radiometer type PO3, pour lequel les réglages suivants donnent satisfaction :

	I / sensibilité	Amortissement	Compensation du et de diffusion	Potentiel exploré
Pb....	10 à 30	10	4 à 6	— 0,3 à — 0,6 v
Cu....	20	9 — 10	2 à 3	— 0,2 à — 0,6 v
Zn....	30 à 70	8	0 à 2	— 0,6 à — 1,5 v
Mn ...	10 à 30	9 — 10	2 à 3	— 1 à — 1,85 v

Expression des résultats

La meilleure méthode est celle de l'incrément. Lorsqu'on a tracé la vague du corps à doser, on ajoute une quantité connue du cation à doser et trace une nouvelle vague. On a :

$$q \text{ en } \gamma = \frac{a_0 V_0}{a_1 V_1 - a_0 V_0} \Delta q$$

où :

a_5 est la hauteur de vague donnée par l'échantillon,
a_1 est la hauteur de vague donnée par l'incrément,
Δq = la quantité (en γ) de cation ajouté,
V_0 = volume initial de solution,
V_1 = volume après addition de Δq.

Dans les dosages effectués, on a $V_0 = 5$ ml ; on ajoute à V_0 0,2 ml de solution contenant 100 γ de Pb et 100 γ de Zn par ml d'où $V_1 = 5{,}2$ml.

$$\Delta q = 20\gamma \text{ il vient donc } q = \frac{100\, a_0}{5{,}2\, a_1 - 5 a_0} \# \frac{20\, a_0}{a_1 - a_0}$$

Microcellule.

Nous avons mis au point un modèle de microcellule (fig. 2) permettant de travailler sur 2 ml de solution. Les dimensions ont été choisies de telle sorte que le capillaire soit suffisamment éloigné de la paroi. La grande surface de l'électrode de référence annulaire lui permet d'avoir une impédance suffisamment faible.

La solution est placée sur le verre fritté F. Si on prend la précaution de diriger l'azote sous ce verre avant le remplissage par manœuvre convenable de R, le liquide ne diffuse pas, le dégazage est extrêmement rapide en raison de la grande dispersion de l'azote. L'anode A de section annulaire permet le passage du courant d'azote et la libre descente du capillaire. La jonction avec l'électrolyte est assurée par le verre fritté *f* collé à l'araldite sur une section droite de l'électrode. O est un orifice de remplissage en KCl saturé. Cette cellule est facilement thermostatable.

d) Dosage de l'aluminium.

Le dosage de faibles quantités d'aluminium est assez difficile en raison de l'absence de réactions spécifiques ; la difficulté est encore accrue lorsque la substance à analyser renferme du fer, ce métal précipitant toujours avec l'aluminium.

Il existe un certain nombre de colorants qui donnent avec l'alumine des laques colloïdales dont l'appréciation colorimétrique est délicate en raison de la difficulté qu'il y a de réaliser des états de dispersion absolu-

ment semblables ; après des essais systématiques, nous avons abandonné l'usage de ces colorants.

Nous avons mis au point un procédé de dosage colorimétrique indirect de l'aluminium reposant sur les propriétés de la 8-hydroxyquinoléine (oxine).

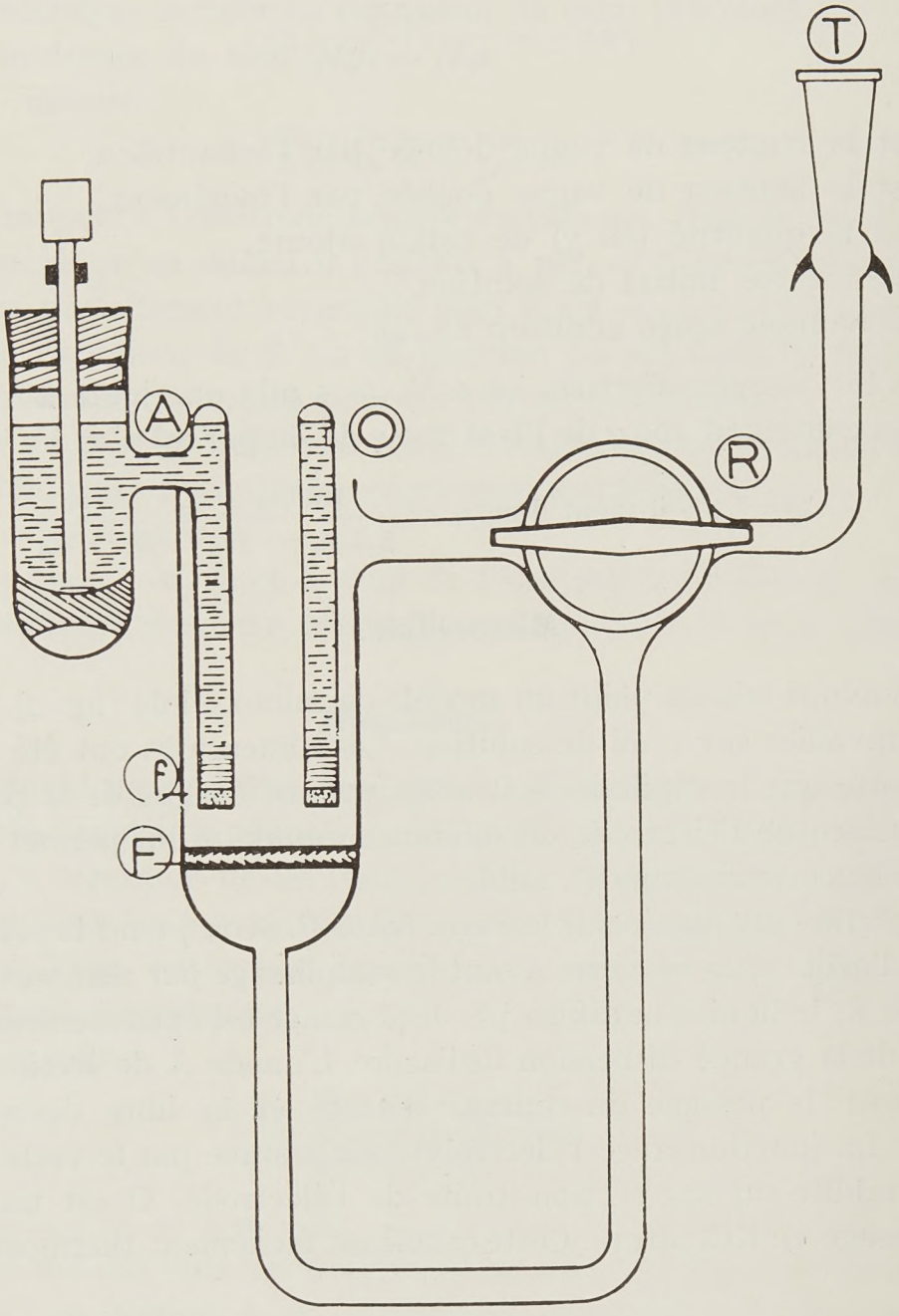


Fig. 2.

Ce réactif donne avec l'aluminium un composé peu soluble dans l'eau ($P_s = 3{,}10^{-32}$), soluble dans l'alcool et le chloroforme en donnant une fluorescence vers 300 mμ. L'oxinate d'alumine précipite dans une gamme étendue de pH, étalée entre 4,9 et 9,8. Le réactif, amphotère, présente un minimum de solubilité au voisinage de pH 7,2, sa solubilité est de $3{,}6\ 10^{-3}$ M/l soit 520 mg/l. Dans la gamme de pH de précipitation

un certain nombre d'ions peuvent précipiter (Cu, Pb, Zn, Mg). Il faudra donc séparer au préalable l'aluminium.

La détection de l'aluminium combiné à l'oxine précipitée se fait en utilisant la réaction de ce corps avec l'ion vanadyle (39-40) : il se forme en milieu acétique normal un précipité brun, soluble en rouge dans l'alcool amylique, qui présente un maximum d'absorption à 550 mμ ; à cette longueur d'onde, on peut doser entre 0 et 100 γ d'aluminium combiné.

Ce procédé permet de travailler dans le visible, donc avec un colorimètre ordinaire. Il est de plus facilement généralisable pour le dosage de n'importe quel cation qu'on peut séparer quantitativement par l'oxine.

Mode opératoire

1° Séparation de l'aluminium : dans un tube à centrifuger conique, on place une prise d'essai contenant au mieux 0,1 mg d'Al^{+++}, on ajoute 1 ml de chlorure ferrique à 50 p. 100 et 1 ml de PO_4Na_2H à 10 p. 100. On neutralise par l'ammoniaque en présence de rouge de méthyle et ajoute 1 ml de CH_3COONH_4 saturé. On porte 10 minutes au bain marie, laisse refroidir, centrifuge, puis on élimine la phase aqueuse. Tout l'aluminium est entraîné par le fer, dans un précipité de phosphate basique.

2° Élimination du fer : on dissout le précipité dans 10 ml d'acide chlorhydrique 2 N. On transvase dans une ampoule à décanter, ajoute 0,5 ml de cupferron à 6 p. 100, puis on extrait 3 fois avec le chloroforme. Une fois le fer éliminé, on élimine le cupferron en extrayant 3 fois au chloroforme l'excès de réactif.

3° Précipitation de l'aluminium : on transvase dans un bécher de 50 ml, chauffe quelques instants pour éliminer le chloroforme, puis en présence de rouge de méthyle, on amène à pH 4,5. On ajoute une seule goutte d'acide 6 N en excès, et porte à 70°. On précipite l'aluminium par 5 gouttes d'oxine à 1 p. 100 dans CH_3COOH normal et ajoute ensuite 5 ml d'acétate d'ammonium à 15 p. 100. Le pH est alors de 5 environ. On laisse refroidir, filtre sur creuset filtrant rempli d'amiante en fibres, et lave 2 fois avec de l'acétate d'ammonium à 1 p. 100 amené à pH 4,6.

4° Colorimétrie : on dissout le précipité dans 1,0 ml d'acide acétique glacial, rince avec 15,0 ml d'eau, on ajoute 0,5 ml de solution saturée de métavanadate d'ammonium. On agite avec 5,0 ml d'alcool amylique ; l'équilibre est assez long à obtenir. On effectue la colorimétrie à 550-560 mμ ; l'étalonnage de l'appareil se fait avec une solution de Cl_3Al qu'on traite dans les mêmes conditions.

La prise d'essai pouvant contenir environ 150 γ d'aluminium, il faut, dans le cas des vins, partir d'un volume de 10 à 20 ml, qu'on minéralise par voie sèche.

Nous avons essayé plusieurs procédés de dosage polarographique de l'aluminium (41 à 44) ; leur difficulté nous les a fait abandonner.

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

(1) KLING (A.), LASSIEUR (A.). — *Ann. Fals. Fraudes*, 123, 1914.
(2) SEMICHON (L.), FLANZY (M.) et LAMAZOU-BETBEDER (M.). — *Ann. Fals. Fraudes*, **23**, 517, 1930.
(3) GAROLA et BRAUN. — *Ann. Fals. Fraudes*, 152, 1917.
(4) LEULIER (A.), VELLUZ (R.) et GRIFFON (L.). — *Bull. Soc. Chim. Biol.*, **10**, 1238, 1928.
(5) LEULIER (A.). — *Ibid*, **15**, 158, 1933.
(6) VANHEMS (R.). — Thèse Doctorat ès sciences, Lyon 1934.
(7) BARRENSCHEEN (H. K.) et MESSINER (L.). — *Biochem. Zeits*, **189**, 308, 1927.
(8) RIBEREAU-GAYON (J.). — *Ann. Fals. Fraudes*, **26**, 297, 1933.
(9) DELEPINE (M.). — *Bull. Soc. Chim. Fr.*, **4**, 3, 643, 1908.
(10) HOSTE (J.). — De toepassing op analytisch gebied van nieuwe organische reagentia, p. 98, Brussels 1952.
(11) PEYNAUD (E.). — *Chim. Anal.*, **7**, 187, 1954.
(12) RIBEREAU-GAYON (J.). et PEYNAUD (E.). — Analyse et contrôle des vins. Béranger, 1958.
(13) NEY (M.). — *Ann. Fals. Fraudes*, 533, 1948.
(14) WOLFF (H.). — *Biochem. Zeitsch.*, **326**, 267, 1954.
(15) HAHN (F. L.) et HARTLEB (E.). — *Zeits. Anal. Chem.*, **71**, 225, 1951.
(16) HIBBARD (P. L.). — *Ind. Eng. Chem. Anal. Ed.*, **9**, 127, 1937.
(17) MARTIN (G.). — *Bull. Soc. Chim. Biol.*, XXXIV, **12**, 1174, 1952.
(18) L'HOTE. — *C. R. Acad. Sci.*, **104**, 853, 1887.
(19) L'équipe du laboratoire de Recherches HOPKINS et WILLIAMS Ltd, Dunod, Paris 1947, pp. 2-11-145.
(20) CHARLOT (G.) et GAUGUIN (R.). — Dosages colorimétriques. Masson, Paris, 1952, p. 97.
(21) CHARLOT (G.) et GAUGUIN (R.). — *Ibid.* p. 98.
(22) STONE (I.), GRAY (P. P.) et KENIGSBERG (M.). — *Wall. Lab. Comm.*, **14**, 297, 1951.
(23) KEIRS (H. J.) et SPECK (S. J.). — *Journ. Dairy Sci.*, **33**, 413, 1950.
(24) PRO (M. J.) et MATHERS (A. P.). — *Journ. Assoc. of. Agric. Chem.*, **37**, 945, 1954.
(25) REICHARD (O.). — *Zeits. Anal. Chem.*, **140**, 188, 1953.
(26) REICHARD (O.). — *Wein und Rebe*, **32**, 668, 1954.
(27) RUDDORF (W.) et ZAUNIER (H.). — *Zeits. Anal. Chem.*, **140**, 1, 1950 et **137**, 1, 1952.
(28) BONASTRE (J.). — *Ann. Fals. Fraudes.*, **48**, 559-60, 1955.
(29) SAMUELSON (O.). — *Svensk. Fren. Tidsk.*, **63**, 307, 1951.
(30) SAMUELSON (O.). — *Chim. Anal.*, **37**, 180, 1955.
(31) SCHWARZENBACH (G.), BIEDERMANN (W.) et BAUGERTER (F.). — *Helv. Chim. Acta*, **29**, 811, 1946.
(32) MIDDLETON (G.) et STUCKEY (R.). — *Analyst*, **78**, 532, 1953.
(33) JAULMES (P.). — Analyse des vins. Poulain, Montpellier, p. 159, 1951.
(34) BONASTRE (J.). — *Chimie Anal.*, **39**, 4, 104-6, 1957.
(35) FISCHER (G.) et LEOPOLDI (R.). — *Z. Angew. Chem.*, **47**, 90, 1934.
(36) BONASTRE (J.) et POINTEAU (R.). — *Chim. Anal.*, **39**, 5, 193-96, 1957.
(37) STOUT (P. R.), LÉVY (J.) et WILLIAMS (L. C.). — *Coll. Czechoslov. chem. comm.*, **10**, 129, 1938.
(38) PECSOK (R. L.). — *Anal. Chem.*, **25**, 561, 1953.
(39) BACH. — *Anal. Asoc. Quim. Arg.*, **28**, 108, 1940.
(40) BACH et TRELLES. — *Ibid.*, **28**, 111, 1940.
(41) PRAZLER (J.). — *Coll. Czechoslov. Chem. Comm.*, **3**, 407, 1931.
(42) HOKVER. — Thèse Doctorat Hambourg 1938.
(43) DE ALMEIDA (H.). — *Anais. Inst. Vinho Porto*, **7**, 11, 1946.
(44) GELLER (B. A.) et SAN'KO (A. M.). — *Zavodsk. Lab.*, **8**, 1030, 1939.

DEUXIÈME PARTIE

RÉACTIONS D'ÉCHANGE D'IONS

Dans le sens le plus général, on peut formuler ainsi une telle réaction

$$RX + Y \rightleftarrows RY + X$$

où X et Y sont des particules de même charge et R un édifice moléculaire quelconque, présentant les propriétés suivantes :

— R est un porteur de charges opposées à X ou Y,

— les composés RX et RY sont insolubles.

Les réactions d'échange d'ions sont très fréquentes dans tous les domaines de la chimie. Depuis quelques années, on a pu mettre au point divers produits de synthèse bien définis, qui trouvent une utilisation aussi bien au laboratoire que dans l'industrie et qui donnent lieu à une abondante bibliographie (1).

Dans bien des cas, les réactions sont stœchiométriques, et on peut dans une certaine mesure formuler une théorie ; mais il peut arriver que des phénomènes d'adsorption modifient l'état final de la réaction. Ceci se rencontre par exemple dans l'étude des réactions que donnent les ferrocyanures insolubles, et qui fera l'objet de la deuxième partie de ce chapitre.

A. — RÉSINES ÉCHANGEUSES D'IONS

I. — THÉORIE SUCCINCTE DES RÉACTIONS

On peut considérer un échangeur de cations comme un électrolyte très insoluble, composé d'un anion à haut poids moléculaire, non diffusible, saturé par un cation qui peut librement diffuser.

On peut appliquer aux réactions d'échange d'ions la théorie des équilibres de membranes de DONNAN. Bien qu'il n'y ait effectivement aucune membrane dans le système échangeur-solution, on peut faire jouer ce rôle à l'interface liquide-solide séparant les deux phases.

Dans ces conditions, la théorie conduit à écrire que, de part et d'autre de l'interface, le produit des activités thermodynamiques des divers ions en présence est constant, soit :

$$\left(\frac{a_x}{a_y}\right)_S \left(\frac{a_y}{a_x}\right)_R = 1 \qquad (1)$$

pour deux cations X^+ et Y^+ de même charge, ou

$$\left(\frac{a_x}{\sqrt{a_z}}\right)_S \left(\frac{\sqrt{a_z}}{a_x}\right)_R = 1 \qquad (2)$$

pour des cations X^+ et Z^{++} de charges différentes.

La diffusion de l'anion associé au cation initialement en solution est régie par le principe d'électro-neutralité, soit :

$$[X^+]_R = [Cl^-]_R + [R^-] \qquad (3)$$

En réalité, la structure de l'échangeur joue un rôle ; GREGOR (2) a été conduit à modifier l'équation d'équilibre en tenant compte de l'énergie due au gonflement de l'échangeur par les ions. Lorsque les ions X et Y ont des volumes spécifiques V_x et V_y différents, l'énergie correspondant au gonflement est donnée par l'équation

$$RT ln \left[\left(\frac{a_x}{a_y}\right)_S \left(\frac{a_y}{a_x}\right)\right]_R = p(V_x - V_y) \qquad (4)$$

où p représente la pression de gonflement. Il en résulte que si V_x et V_y sont différents, on a

$$\left(\frac{a_x}{a_y}\right)_S \left(\frac{a_y}{a_x}\right)_R = K_D \qquad (5)$$

K_D est le *coefficient de sélectivité* de la réaction. Il varie beaucoup avec la nature physique du polymère constituant l'échangeur.

En première approximation, les relations (3) et (5) permettent théoriquement de résoudre le problème. Cependant, la constante d'équilibre peut se trouver modifiée par la formation de complexes entre l'échangeur et les cations en présence ; ceci s'observe surtout avec les échangeurs carboxyliques ou phénoliques, et explique dans une certaine mesure la sélectivité des premiers vis-à-vis du cuivre ou du fer.

De toute manière, l'application de la loi d'action de masses à ces équilibres est difficile, car on ne connaît pas en général les coefficients d'activité dans la phase résine. On ne peut pas, en effet supposer que les deux formes RX et RY que l'on trouve à l'équilibre, ont une activité égale à 1, comme dans la réaction :

$$BaCO_3 + SO_4^{--} \rightarrow BaSO_4 + CO_3^{--}$$

où

$$K = \frac{|CO_3^{--}|}{|SO_4^{--}|} \qquad (6)$$

Kerr (3) a attribué des coefficients d'activité aux deux formes RX et RY, ce qui permet de conserver l'équation (5).

On peut cependant résoudre en pratique le problème en calculant une *constante d'équilibre apparente.*

Si les ions X^+ et Y^+ ont même charge et qu'au cours de la réaction la force ionique de la solution ne varie pas, on peut remplacer activités par concentrations.

On aura donc :

$$\left(\frac{\gamma_x C_x}{\gamma_y C_y}\right)_s = K_1 \left(\frac{\gamma_x C_x}{\gamma_y C_y}\right)_R \quad (7)$$

où K_1 est la constante théorique d'équilibre, γ les coefficients d'activités, C les concentrations, qui devient :

$$\left(\frac{C_x}{C_y}\right)_s = K'_1 \left(\frac{\gamma_x C_x}{\gamma_y C_y}\right)_R \quad (8)$$

Si on ne considère que les concentrations, on fera apparaître une *constante apparente* K d'échange :

$$\left(\frac{C_x}{C_y}\right)_s = K \left(\frac{C_x}{C_y}\right)_R$$

D'autres théories ont été proposées ; aucune ne prétend donner une solution définitive du problème qui est assurément bien plus complexe que ces quelques lignes ne l'ont laissé voir.

II. — ÉVALUATION ET CARACTÉRISATION DES RÉSINES

a) Capacité.

La notion la plus importante à connaître est la *capacité* c'est-à-dire la quantité totale d'ions mobilisables par unité de masse de résine sèche. Au laboratoire on exprime d'ordinaire cette capacité en milliéquivalents par gramme d'échangeur sec. Les résultats calculés ci-dessous se rapportent aux produits industriels bruts, ceci pour des raisons pratiques.

Mode opératoire

Cinq grammes d'échangeur sont mis à tremper pendant 24 heures dans l'eau distillée et rincés plusieurs fois ; on transvase ensuite dans une burette et, dans le cas le plus fréquent où le produit est vendu sous la forme R-H, on traite par 100 à 150 ml de solution à 10 p. 100 de NaCl qu'on fait couler à la vitesse de 1 ml m^{-1} environ ; on rince à l'eau distillée. On recueille tout le liquide et l'eau de rinçage, complète à 250 ml et dose l'acidité sur 50 ml en présence d'hélianthine.

Cette technique est la plus simple et la plus précise, mais elle ne

s'applique qu'aux échangeurs sulfoniques. Pour les autres, il est indispensable d'opérer par déplacement suivant la technique décrite par GREGOR et BREGMAN (4).

b) **Coefficient d'échange.**

Si on considère la réaction d'échange, nous avons vu ci-dessus qu'on peut définir une constante apparente

$$K = \frac{C_{x_R}}{C_{y_R}} \cdot \frac{C_{y_S}}{C_{x_S}}$$

valable dans certaines conditions de concentrations et de volume.

L'utilité de cette valeur est de permettre la comparaison d'échangeurs entre eux, ou encore, dans des conditions expérimentales données, d'étudier la sélectivité d'un échangeur déterminé pour tel ou tel ion.

Les coefficients calculés ci-dessous ne sont donc valables que dans les conditions suivantes :

— Soit C la capacité d'un échangeur, en méq/g. 5 g du produit sous forme sodique sont mis en contact avec 50 ml d'une solution renfermant 5 C méq d'une solution du cation à étudier.

On agite pendant 2 heures ; on centrifuge et dose le cation restant en solution.

On calcule ensuite K_{Na}^{Me} qui est la constante apparente d'échange.

On a déterminé ainsi les valeurs rassemblées dans le tableau suivant.

TABLEAU I

Nom	Nature	C	K_{Na}^{K}	K_{Na}^{H}	K_{Na}^{Ca}	K_{Na}^{Mg}	K_{Na}^{Cu}	K_{Na}^{Fe}
Amberlite IR 120	Polyrènesulfoné	3,51	0,78	3,5	2,06	2,62	3,37	7,08
Duolite C20.....	id.	3,1	1,49	3,1	1,3	3,37	3,37	1,17
Dowex 50	id.	2,47	1,40	2,5	1,43	2,98	2,32	1,17
Dusarit	Charbon sulfoné	1,49	1,08	1,54	1,82	2,06	3,82	3,62
Amberlite IR 105	Phénolique	2,00	1,27	—	2,06	2,98	5,61	9,97

Pour des raisons pratiques, on a calculé

$$K_{Na}^{Me} = \frac{[Na^+]_S^n \quad [Me^{n+}]_R}{[Na^+]_R^n \quad [Me^{n+}]_S}$$

où les quantités entre crochets sont les concentrations exprimées en milliéquivalents par litre.

c) **Examen de la stabilité des échangeurs.**

Les échangeurs commerciaux utilisés couramment présentent une solubilité pratiquement nulle, tout au moins lorsqu'ils ont subi plusieurs cycles de régénération. Cependant, il est nécessaire de le vérifier dans la mesure du possible. Les échangeurs d'anions sont en général moins résis-

tants, physiquement et chimiquement, que les échangeurs de cations ; certains se décomposent légèrement en présence d'acide chlorhydrique ; nous avons donc étudié leur comportement vis-à-vis de ce réactif.

Échangeurs de cations.

5 grammes d'échangeur subissent plusieurs cycles de régénération par HCl N, alternés avec des traitements par NaCl à 10 p. 100. Finalement, l'échangeur, sous la forme acide, est lavé jusqu'à neutralité.

On met en suspension dans 500 ml d'eau distillée, agite pendant 24 heures ; on centrifuge le liquide, évapore à sec 450 ml pour déterminer le poids des résidus. On fait un essai témoin avec de l'eau distillée.

On refait cet essai avec de l'eau alcoolisée à 20°. L'expérience est reprise avec l'échangeur sous forme sodique.

Dans tous les cas, la solubilité des échangeurs de cations DOWEX 50, DUOLITE C20, DUSARIT, AMBERLITE IR 105 et IR 120 a été trouvée rigoureusement nulle.

Échangeurs d'anions.

Nous avons spécialement étudié le cas des échangeurs AMBERLITE IR 4 B (base forte) et IRA 400 (base faible). A l'état brut, ces résines contiennent environ 3,5 mg de produits solubles dans l'eau distillée par gramme de résine.

α) Après trempage pendant 4 jours dans l'eau distillée, puis rinçage soigné, on fait passer sur 6 g d'échangeur 400 ml d'eau, qu'on centrifuge et évapore à sec.

β) On lave 6 grammes d'échangeur avec 200 ml de soude N, rince jusqu'à neutralité, lave avec 400 ml d'eau, dont on détermine l'extrait.

γ) On fait subir à la résine huit cycles complets de régénération avec passage alternés de solution saturée de bitartrate de potasse. Après le 8° cycle, on rince, passe 400 ml d'eau, dont on détermine l'extrait sec. Les échangeurs sont traités par 50 ml d'acide chlorydrique environ normal, on constate, dans la masse de résine AMBERLITE IR 4B un dégagement gazeux ; nous avons caractérisé ce gaz comme étant de l'aldéhyde formique.

δ) On rince jusqu'à neutralité, on fait subir à l'échangeur 8 cycles complets comme ci-dessus, on rince soigneusement et détermine la solubilité.

Les résultats de ces essais sont rassemblés dans le tableau ci-dessous :

TABLEAU II

Solubilité des échangeurs d'anions dans diverses conditions.

(Exprimé en mg par gramme d'échangeur)

	Résine brute	Essai α	Essai β	Essai γ	Essai δ
Amberlite IR 4B	3,5	0,3	0,15	0,05	0,3
Amberlite IRA 400.....	3,5	0,05	0,05	0,00	0,00

Remarque. — Toutes ces déterminations ont été effectuées plusieurs fois ; tous les récipients étaient, après lavage soigné, rincés à la vapeur ; l'eau et l'alcool étaient distillés deux fois dans un appareil entièrement en Pyrex ; un essai témoin était effectué chaque fois.

Par conséquent, l'emploi d'échangeurs d'anions doit se faire avec beaucoup de précautions, spécialement dans le cas de leur utilisation pour le traitement de substances destinées à l'alimentation, et ces observations, parmi bien d'autres militent, en faveur de leur interdiction dans ce domaine.

III. — COURBES DE TITRATION DES ÉCHANGEURS DE CATIONS

Il existe différentes sortes d'échangeurs de cations, caractérisés non seulement par la structure du squelette hydrocarboné, mais surtout par

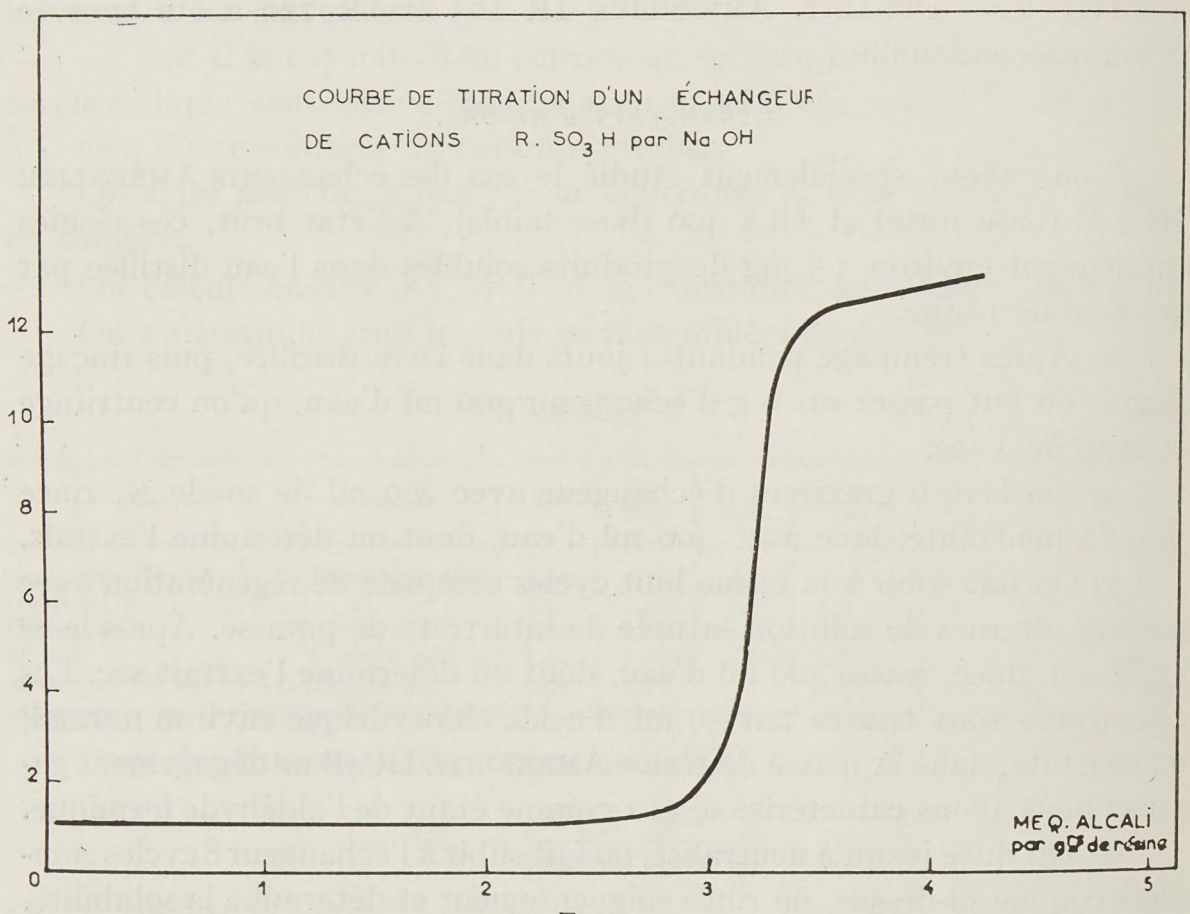


Fig. 3.

la nature du groupe fonctionnel qui précisément communique à ces corps leur caractère ionique. Lorsque tous les groupes polaires sont saturés d'ions hydronium, l'échangeur est dit « sous forme acide » et on peut tracer une courbe de neutralisation d'aspect semblable à celle que donne un acide entièrement soluble.

Nous reproduisons ci-après la courbe de neutralisation d'un échangeur sulfonique $R.SO_3\ H$ (fig. 3). Cependant, si on opère à différentes

forces ioniques, on constate que les courbes sont décalées sur l'axe des ordonnées. Ceci conduit à penser que la courbe tracée n'est pas simplement due à la réaction.

$$R \cdot SO_3H + NaOH \rightarrow R \cdot SO_3Na + H_2O$$

ou, mieux

$$H^+_R + OH^-_S \rightarrow H_2O$$

mais à l'ensemble des réactions

$$R \cdot SO_3H + Na^+_S \rightarrow R \cdot SO_3Na + H^+_S$$
$$H^+_S + OH^-_S \rightarrow H_2O$$

Dans ces conditions, la loi d'action de masses appliquée à l'équilibre s'écrit

$$\frac{[H^+]\ [NaR]}{[Na^+]\ [HR]} = K$$

où les termes entre crochets représentent les activités des espèces en présence.

Ceci peut encore s'écrire

$$K = \frac{[H^+]\ (NaR)\ \gamma NaR}{(Na^+)\ \gamma Na(HR)\gamma HR}$$

les termes entre parenthèses représentant des concentrations et les γ des coefficients d'activité. On calcule ainsi le pH en un point de la courbe

$$pH = pK + \log \frac{(NaR)}{(HR)} + \log \frac{\gamma NaR}{\gamma HR\ \gamma Na} + pNa$$

Cette relation montre qualitativement (puisque l'on ne connaît pas les coefficients d'activité) l'influence de la force ionique (liée à pNa) sur la position de la courbe de neutralisation.

Les pK apparents de différents échangeurs peuvent être ainsi déterminés.

Nous avons trouvé les valeurs suivantes pour divers types d'échangeurs :

polystyrène sulfoné	pK = 1,7
échangeur carboxylique	pK = 5,7
échangeur phénolique	pK = 10

Ces valeurs nous permettent de prévoir le comportement de différents types d'échangeurs vis-à-vis de solutions tamponnées.

a) **Cas des résines sulfoniques.**

Nous pouvons écrire

$$pH - pK = \log \frac{[RNa]}{[RH]}$$

On voit que la dissociation de ces acides forts est complète même à pH très bas ; la résine pourra réagir avec tous les cations de la solution jusqu'à sa complète saturation.

Le traitement des vins par des échangeurs sulfoniques sous forme sodique R. SO_3Na a été proposé en vue d'éviter une acidification du vin. Sous cette forme, l'échangeur est neutre, et complètement dissocié.

L'application de l'équation ci-dessus montre immédiatement qu'une solution tamponnée à pH inférieur à 7 perd une partie de ses ions H^+ afin que la relation soit satisfaite. Effectivement l'expérience montre qu'une solution d'un sel de sodium tamponnée à pH 3, traitée par l'échangeur Dowex 50 à raison de 10 g par litre, sous forme sodique, perd environ 1 p. 100 de son acidité. Un vin de même pH se comporte identiquement dans les mêmes conditions, malgré la présence d'alcool et la complexité de sa composition.

b) Cas des échangeurs carboxyliques.

Leur pK étant égal à 5,7 ces échangeurs sont, sous leur forme acide, très peu dissociés à pH 3 ; ils ne doivent donc produire aucune réaction. Au contraire, sous forme sodique, leur réaction est alcaline et, pour que l'activité des ions $[H^+]$ de la solution diminue, ils produiront une importante désacidification.

c) Vérifications expérimentales (5)

α) *Échangeurs sulfoniques* : Influence du pH des solutions sur les échanges en cycle salin.

Cet essai a été entrepris pour étudier les modifications d'acidité dues à l'emploi d'échangeurs sulfonés.

L'application des lois générales des échangeurs laisse prévoir qu'un échangeur sulfoné sodique, doit abaisser d'environ 1 p. 100 l'acidité d'une solution tamponnée à pH 3 qui le traverse ou qui le baigne.

Nous avons utilisé une solution saturée de bitartrate de potassium, amenée à différents pH par addition d'acide tartrique ou de potasse ; 50 ml de solution étaient agités pendant 90 minutes avec 2,5 grammes de résine sous forme R. SO_3Na ; au bout de ce temps, après filtration, on dosait l'acidité totale et les métaux présents dans la solution. Le tableau ci-dessous rassemble les résultats obtenus.

Tableau III

Influence du pH des solutions sur l'échange ion hydrogène-sodium.

Solution témoin					Solution traitée				
pH	A. totale méq/l	K méq/l	Na méq/l	Somme méq/l	pH	A. totale méq/l	K méq/l	Na méq/l	Somme méq/l
2	52,0	25,3	0	77,3	2,4	43	5,1	31	79,1
2,5	42,0	25,3	0	67,3	2,7	37	3,1	26,9	67,0
3	33,0	25,3	0	58,3	3,1	29	2,9	26	57,9
3,5	26,5	25,3	0	51,8	3,5	23,5	2,6	25,2	51,3
4,0	12,5	42,2	0	54,7	4,0	12,5	5,6	36	54,1
5,0	2,0	56,0	0	58,0	5,0	2,0	8,8	47	57,8

Ce tableau montre bien que, jusqu'à un pH légèrement supérieur à 3,5 l'échangeur sodique produit une légère désacidification. Dans le cas présent, à pH 3,5, elle atteint environ 11,5 p. 100. Cependant, on ne risque pas un tel abaissement d'acidité dans les vins, ceci principalement pour deux raisons :

— le vin est une solution dont le coefficient tampon est beaucoup plus fort que celui de la solution de bitartrate utilisée ;

— on n'emploie jamais, comme nous l'avons fait ici, une quantité de résine si importante ; dans la pratique, on traite à raison de 10 g de résine par litre ; ici, nous en avions utilisé cinq fois plus.

Dans un autre essai, nous avons pu éviter toute désacidification des solution utilisées en traitant l'échangeur sodique, avant le passage de la solution de bitartrate, par une solution tamponnée acétate de sodium-acide acétique au même pH.

D'après les lois d'équilibre des échangeurs, le résultat positif de l'expérience était évident.

β) *Cas des résines carboxyliques* : Il s'agit de réaliser la réaction :

$$R \cdot COOH + Na^+ \rightarrow R \cdot COONa + H^+$$

Si on traite la résine par une solution de Na Cl, les ions H^+ qui prendraient naissance empêchent toute dissociation de la résine carboxylique, dont le pK, nous le savons, est égal à 5,7. La seule façon de faire passer les résines sous la forme R. COO Na consiste à traiter l'échangeur par une solution du sel sodique d'un acide plus faible que R. COO H. En pratique, une solution de bicarbonate de sodium permet la réaction.

TABLEAU IV

Influence du pH sur les échanges
avec AMBERLITE IRC 50 *sous forme sodique.*
Solution de bitartrate de K saturée. Résultats en milliéquivalents par litre.

Solution témoin					Solution traitée							
					par résine régénérée au CO_3 NaH				par résine régénérée au NaCl			
pH	A. T	K	Na	Somme	A. T	K	Na	Somme	A. T	K	Na	Somme
3	36	26,9	0	62,9	0	16	53,6	63	7	20	35,2	62,2
4	18	32,2	0	50,2	0	11	39,5	50,5	1	19	30,8	48,8
5	3	43	0	46	0	17	28	48	0	23,8	22,2	46

Lorsqu'on lave un tel échangeur avec de l'eau distillée, les ions H^+ de l'eau tendent à s'échanger avec le sodium de la résine, et l'eau de rinçage est toujours alcaline, même lorsque tout le bicarbonate en excès a

été éliminé. Si on poursuit indéfiniment le lavage, le capacité d'échange diminue, car l'échangeur s'appauvrit en sodium.

Nous avons tourné la difficulté de la manière suivante. Lorsque la régénération par le bicarbonate est terminée, on lave avec une solution à 1 p. 100 de NaCl, jusqu'à élimination complète de l'alcalinité. La présence des ions Na^+ et Cl^- s'oppose à la dissociation de la résine, et la seule alcalinité est due à l'excès de bicarbonate. Quand l'eau de lavage est neutre, on rince à l'eau distillée jusq'à élimination des ions Cl^-. Cette élimination est rapide, et l'hydrolyse de la résine pendant ce lavage est négligeable.

Un essai comparatif des deux modes de régénération est rapporté dans le tableau précédent, qui met en outre en évidence l'influence du pH des solutions sur l'importance de l'échange.

D'autres résultats, mais spécialement appliqués au cas des vins, seront donnés dans la troisième partie.

4. — LA RÉGÉNÉRATION SALINE MIXTE

Les essais rapportés ci-dessous ont été entrepris pour réfuter une objection formulée envers les échangeurs de cations en cycle sodique pour le traitement des vins. On a en effet reproché à ce procédé d'enrichir exagérément en sodium le vin traité, ce qui par conséquent entraîne une importante diminution en cations alcalino-terreux, surtout en Mg^{++}, dont le rôle biologique est important. Le sodium aurait pour autre effet de donner aux vins traités une saveur désagréable.

On a proposé (6) d'ajouter des ions Mg^{++} à la solution saline utilisée pour régénérer l'échangeur ; nous nous proposons d'étudier expérimentalement les conditions que l'on doit respecter pour que le rapport $\frac{\text{cations alcalino-terreux}}{\text{cations alcalins}}$ ne soit pas trop modifié dans le vin traité.

a) Échange de deux ions de valences différentes avec un échangeur en cycle sodique.

L'examen de la formule d'équilibre d'échange montre clairement que les cations sont d'autant mieux fixés par l'échangeur que leur nombre de charges est plus élevé.

Si par conséquent on traite par une résine en cycle sodique une solution contenant à la fois des ions K^+ et Mg^{++}, nous devons nous attendre à fixer Mg^{++} plus sélectivement que K^+. Nous avons fait passer, sur une colonne de Dowex 50 sodique des solutions de chlorures de K^+ et Mg^{++} telles que le rapport des concentrations $x = \frac{[Mg^{++}]}{[K^+]}$ varie dans d'assez larges limites. A intervalles réguliers, on prélevait des échantillons pour

doser les 3 ions K^+, Na^+ et Mg^{++}. Les résultats sont rassemblés dans les tableaux suivants :

Tableau V

Variations de la composition de solution ClK-ClMg au cours du passage sur une colonne de Dowex 50 *sodique.*

Volume total de chaque essai ..... 2,2 litres
Volume de chaque fraction ..... v = 100 ml

Les compositions ci-dessous se rapportent à une composition pratiquement instantanée de la solution et non à la composition moyenne de chaque fraction.

N. B. Pour alléger ce tableau on ne donne que la composition tous les 2 n v ml.

Numéros des fractions successives	Composition de la solution traitée (en méq/litre)			
	Mg	K	Na	Somme
a) rapport de concentrations x = 8,42				
Témoin = 0	110	13	0	123
2	0	0,4	122	122,4
4	0	0,4	122	122,4
6	0	0,64	122	122,64
8	5	3,33	115	123,33
10	31	*14,6*	74	122,6
12	86	*20*	19	125
14	106	*18*	0	124
16	110	14,1	0	124,1
b) rapport des concentrations x = 1,2				
Témoin = 0	63	50,3	0	113,5
2	0	0,53	113	113,3
4	0	0,33	113	113,3
6	0	0,69	112	112,69
8	1	4,6	107	112,6
10	2	16,5	95	114,5
12	6	*55,1*	53	114,1
14	10	*101*	5	116,0
16	33	*80,5*	0	113,5
18	60	*52,5*	0	112,5
20	63	50,3	0	113,3
c) rapport des concentrations x = 0,48 ; concentration ionique totale = 80 méq/l				
Témoin = 0	24	56	0	80
2	0	0	80	80
4	0	1	80	81
6	0	16	65	81
8	0	51	28	79
10	1,5	*70*	9	80,5
12	6,5	*73*	0	79,5
14	11,5	*70*	0	81,5
16	17	*62*	0	79
18	20	*61*	0	81
20	23,5	55	0	78,5
22	24	56	0	80

Nous constatons que, dans tous les cas, la concentration en potassium passe par une valeur maxima, supérieure à la valeur initiale. Ceci est dû au fait que l'échangeur, initialement à l'état sodique pur, puis

transformé en partie en $R.SO_3K$, réagit sous cette forme avec le magnésium

$$2R\cdot SO_3K + Mg^{++} \rightleftarrows (RSO_3)_2\,Mg + 2K^+$$

lorsque $$\left(\frac{a_K}{\sqrt{a_{Mg}}}\right)_S \rightarrow K_K^{Mg}\left(\frac{a_K}{\sqrt{a_{Mg}}}\right)_R$$

Lorsque les deux membres sont égaux, la solution est en équilibre avec l'échangeur et rien ne se produit plus.

Pour opérer de manière commode, on a réalisé l'appareil schématisé figure 4 qui permet de prélever un échantillon de l'importance que l'on

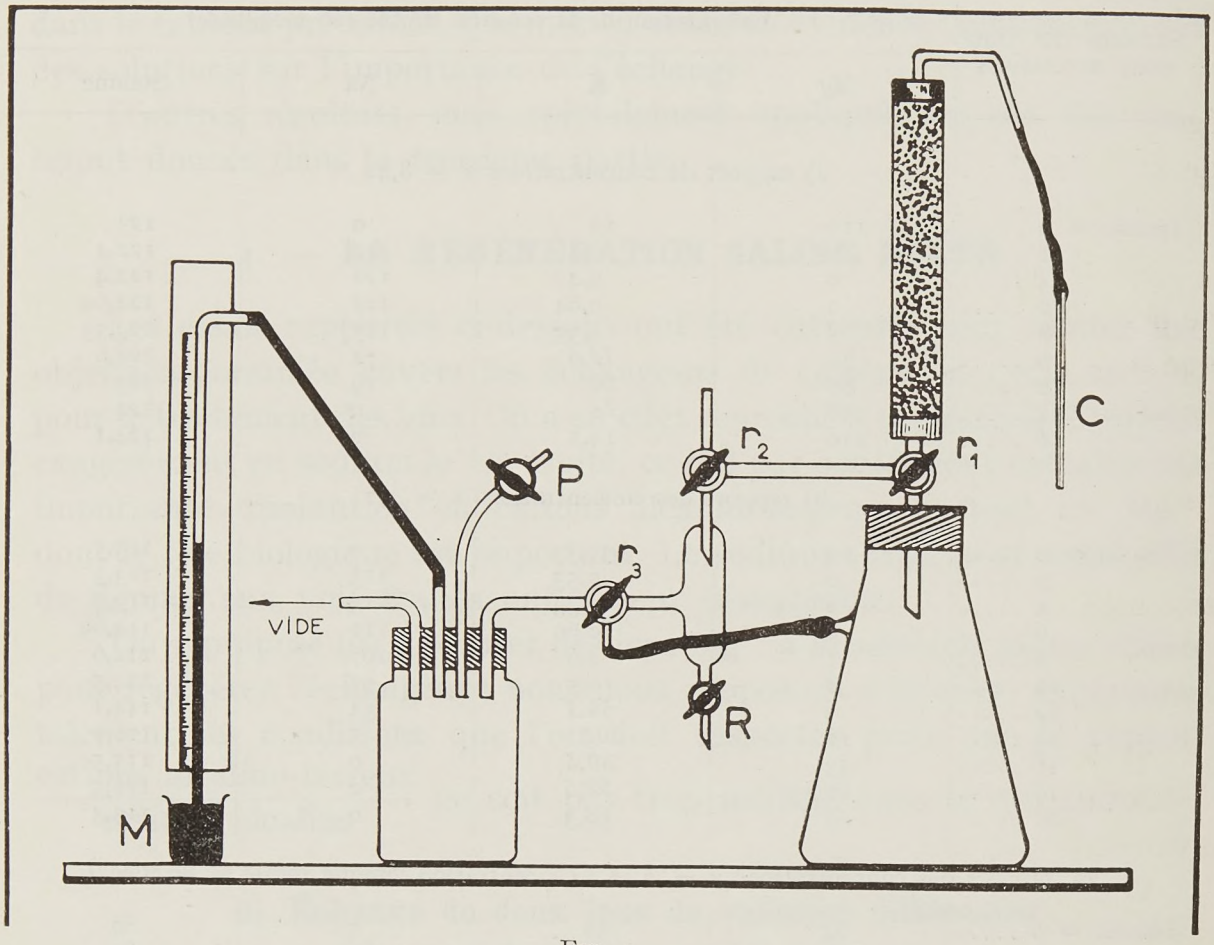


FIG. 4.

veut, à n'importe quel moment. La régulation du débit est assurée par le capillaire C et le robinet à pointeau P ; les variations sont de l'ordre de ± 1 p. 100. On peut, en cas de besoin, travailler à l'abri de l'air.

L'étalonnage empirique du manomètre M est fonction de la perte de charge dans la colonne (qui ne varie sensiblement pas en cours d'essai), des dimensions du capillaire et de la viscosité de la solution.

La manœuvre des robinets pour le prélèvement peut se passer de tout commentaire.

b) Régénération saline mixte.

On a tenté d'établir sans calcul ce qui se passe lorsqu'on procède à l'élution de la colonne de résine contenant un mélange de cations par une solution d'ions potassium.

Ceci constitue en quelque sorte un développement par déplacement, à ceci près que le potassium présente moins d'affinité pour l'échangeur que le Mg. Cependant, par le jeu des concentrations on peut espérer avoir une certaine élution du magnésium si on se place dans des conditions convenables. Nous avons pris arbitrairement au départ un rapport de concentration dans la résine $\frac{Mg^{++}}{Na^{+}} = \frac{1}{10}$.

Soit une colonne de résine DOWEX 50 de capacité totale mesurée égale à 11,8 méq. Après régénération sodique, on la traite par 1,18 méq. de magnésium ; on rince, on vérifie que tout le Mg introduit a été fixé.

L'état de la colonne est : 1/10 (RMg/2 + 9 RNa).

α) Dans un premier essai faisons passer sur cette colonne 11,8 méq de potassium et dosons le magnésium dans le liquide effluent ; on trouve que *seulement* 0,1 méq de magnésium a été entraîné, échangé, par le potassium. Nous vérifions ainsi que le métal bivalent est difficilement déplaçable par l'ion monovalent. Si on veut chasser tout le magnésium de la colonne, il faut employer environ 150 méq de potassium.

β) Reprenons une colonne identique, dans laquelle on introduit 11,8 méq de K^{+} + 3 méq de Mg^{++}, la colonne, même travaillant à saturation, est capable de retenir le magnésium de la solution qu'on lui présente.

γ) Répétons l'expérience, en versant dans la même colonne 23,6 méq de K et 6 méq de Mg. Dans l'éluat, on trouve seulement 2,1 méq de métal bivalent.

Ces trois essais montrent que l'ion bivalent est très solidement fixé et que sa présence dans la colonne ne ralentit que très peu ou pas du tout sa fixation. Dans ces essais, le rapport $\frac{Mg^{++}}{K^{+}}$ dans la phase résine était pris égal à 1/10 ; on avait proposé un rapport voisin de 1/70 ; il n'est pas étonnant que les solutions ainsi traitées soient aussi pauvres en Mg^{++} que celles traitées par le cycle sodique simple.

Pour que la régénération magnésienne ait un effet vraiment marqué, il faut que l'activité des ions Mg^{++} dans la résine soit plus grande que dans le vin.

Nous avons cherché expérimentalement la teneur en magnésium qu'il convient de fixer ; nous avons trouvé que la résine doit être environ moitié sous forme sodique, moitié sous forme magnésienne. Nous désigne-

rons, dans la suite, l'échangeur $\frac{1}{2}\left(R \cdot \frac{Mg}{2} + R \cdot Na\right)$ par « échangeur salin mixte », étant entendu que ce terme représente bien 50 p. 100 de résine sous forme sodique, l'autre moitié étant sous forme magnésienne.

c) Comparaison de divers types de régénération.

Soit une solution de cations alcalins et alcalino-terreux, ayant environ même composition et même pH que le vin.

Nous l'avons soumise à plusieurs essais de passage sur échangeurs régénérés de diverses façons :

a) Échangeur sous forme sodique pure ;

b) Échangeur sous forme magnésienne pure ;

c) Échangeur sous forme acide.

Nous avions pensé, en effet, qu'il serait théoriquement possible d'effectuer une régénération magnésienne pure, ce métal n'ayant aucune influence défavorable sur la tenue ou le goût du vin, et ne présentant à priori aucun inconvénient d'ordre bromatologique, même consommé à dose élevée. Les résultats analytiques sont rassemblés dans le tableau ci-dessous.

TABLEAU VI

Comparaison de trois types de régénération.
Etude sur une solution synthétique à pH 3,3.
Echangeur DOWEX 50 *employé à* 20 *g/litre et* 10 *g/litre de solution.*

	Témoin	Cycle magnésien pur		Cycle sodique pur		Cycle acide	
		20 g/l	10 g/l	20 g/l	10 g/l	20 g/l	10 g/l
pH	3,3	3,3	3,3	3,3	3,3	1,8	2,6
Ac. totale méq.	55	52	53	53,5	53,5	91	79
K méq/l.....	20,4	9,8	17,8	0	8,7	16,4	8,6
Na méq/l.....	9,5	6,1	6,8	37	27,8	8,2	4,35
Ca méq/l.....	3,3	0	0	0	0	0	0
Mg méq/l.....	5,9	25	16	0	2,1	0	1,15
Somme	93,1	92,9	93,6	90,5	92,1	115,6	93,10

Cet essai a été effectué à trois vitesses de passage différentes ; les résultats obtenus sont pratiquement semblables. On constate :

— une très légère diminution d'acidité dans le cas du traitement salin, ce qui est, en somme, normal, d'après ce que nous avons vu précédemment.

— que la régénération sodique élimine une très forte quantité de potassium et de magnésium ; l'enrichissement en sodium est très considérable ; le cycle magnésien élimine suffisamment de potassium pour éviter tout

danger de précipitations, mais l'augmentation du taux de magnésium, bien que tout à fait inoffensive, peut être jugée exagérée.

C'est pourquoi, pour redonner à la solution un équilibre ionique moins en faveur des alcalino-terreux, nous avons essayé la régénération saline en cycle double.

Ce traitement est en quelque sorte une étape intermédiaire entre le cycle sodique pur et le « cycle salin mixte » qui nous semble la solution la plus satisfaisante. Traitons notre solution de cations par une colonne de résine sodique, à raison de 10 g de résine par litre de solution.

Pour la débarrasser du sodium en excès, traitons-la ensuite par une colonne de résine magnésienne (10 g/litre).

Nous pouvons, au moyen de l'appareil de laboratoire précédemment décrit, suivre l'évolution des différents cations au cours du traitement (voir tableau).

TABLEAU VII

Après passage d'un litre sur colonne sodique, la solution est traitée par une colonne de résine magnésienne, à raison de 10 g par litre.

Composition des fractions successives. Les résultats sont exprimés en méq par litre.

	K	Na	Mg	Ca	Somme
Témoin	20,4	8,5	5,9	3,3	38,1
Après colonne sodique	12	26	0	0	38,0
Durant le cycle magnésien au bout de 100 ml	1,0	11,3	24	0	36,3
200	2,8	18,6	15,6	0	37,0
300	7,0	18,6	11,6	0	37,3
400	9,0	20,8	9,0	0	38,8
500	9,0	21	8,0	0	38,0
600	10,0	21,2	6,0	0	37,2
700	10,0	21,5	5,4	0	36,9
800	11,0	21,8	4,4	0	37,2
900	11,0	21,8	3,2	0	36,0
Moyenne (*)	5,7	18	13,6	0	37,3

(*) Composition moyenne finale calculée.

On a calculé la composition de la solution finale, l'importance des prises d'essai pour les dosages en cours de traitement faussant complètement la détermination de la composition de l'ensemble.

Nous constatons :

1° que la teneur en sodium de la solution a diminué ; 18 méq par litre représentent une dose assez forte, mais non prohibitive à notre avis.

2° que le potassium a été assez affecté par le traitement magnésien ; la quantité de K — 5,7 méq/litre — n'est pas susceptible de provoquer une précipitation dans le vin.

3° que l'équilibre d'échange a été modifié en faveur d'une augmentation de la teneur en magnésium dans le liquide traité ; la valeur obtenue pour ce taux serait très acceptable pour un vin.

4° que la somme des valeurs obtenues est à peu près constante ; les bilans de cations sont fidèles ; les méthodes analytiques précédemment décrites sont donc dignes de toute confiance.

De cette série d'essais, nous pouvons conclure que le traitement en cycle salin double présente certains avantages sur le cycle sodique simple, et évite les objections principales qu'on avait pu lui offrir.

Étude de l'échange en fonction de la vitesse d'écoulement.

On a étudié l'action de la vitesse de passage de la phase liquide sur le taux d'échange. Une colonne de 20 g de DOWEX 50 sous sa forme sodique était montée dans l'appareil précédemment décrit ; on la faisait traverser par une solution contenant des ions K^+ à raison de 1 g/litre ainsi que les autres cations contenus habituellement dans le vin (Ca, Mg, Na, Fe) ; on n'a suivi que l'évolution du taux de K^+ avec la vitesse de percolation.

TABLEAU VIII

Évolution du taux de potassium du vin traité en fonction de la vitesse.

K méq/l

Volume ml	V = 140 ml/h	V = 250 ml/h	V = 350 ml/h
Témoin	25,6	25,6	25,6
20	0,3	1,0	2,15
100	0,3	0,89	1,70
200	0,2	0,74	1,48
300	—	0,66	1,30
400	—	0,64	1,30
500	—	0,64	1,30
600	—	0,64	1,48
700	0,2	0,76	3,92
800	0,2	1,23	5,25
900	0,33	3,28	9,20
1000	—	6,28	16,4
1100	—	10,7	17,4
1200	6,66	20,7	19,7
1300	14,80	—	23,1
Ensemble	6,4	8,7	11

On a travaillé aux vitesses de 140 ml/hl, 250 ml/hl, 350 ml/hl. Le volume total de solution utilisé était de 1 450 ml ; tous les 100 ml, un prélèvement permettait de suivre le potassium par photométrie de flamme.

Les résultats sont matérialisés par la courbe figure 5. Sur ce graphique, les courbes représentent l'évolution du potassium, tandis que les droites joignent l'ordonnée correspondant au témoin à l'ordonnée correspondant à l'ensemble de la solution après homogénéisation, et retour dans le liquide traité du reste des prélèvements effectués pour les dosages. Chaque dosage demandant environ 1 ml de solution on admettra que la composition de l'ensemble n'est pas affectée par les échantillons nécessaires aux analyses.

Ces essais, qui ont été repris plusieurs fois avec d'autres vitesses, montrent que l'efficacité du traitement est une fonction linéaire de la vitesse de percolation.

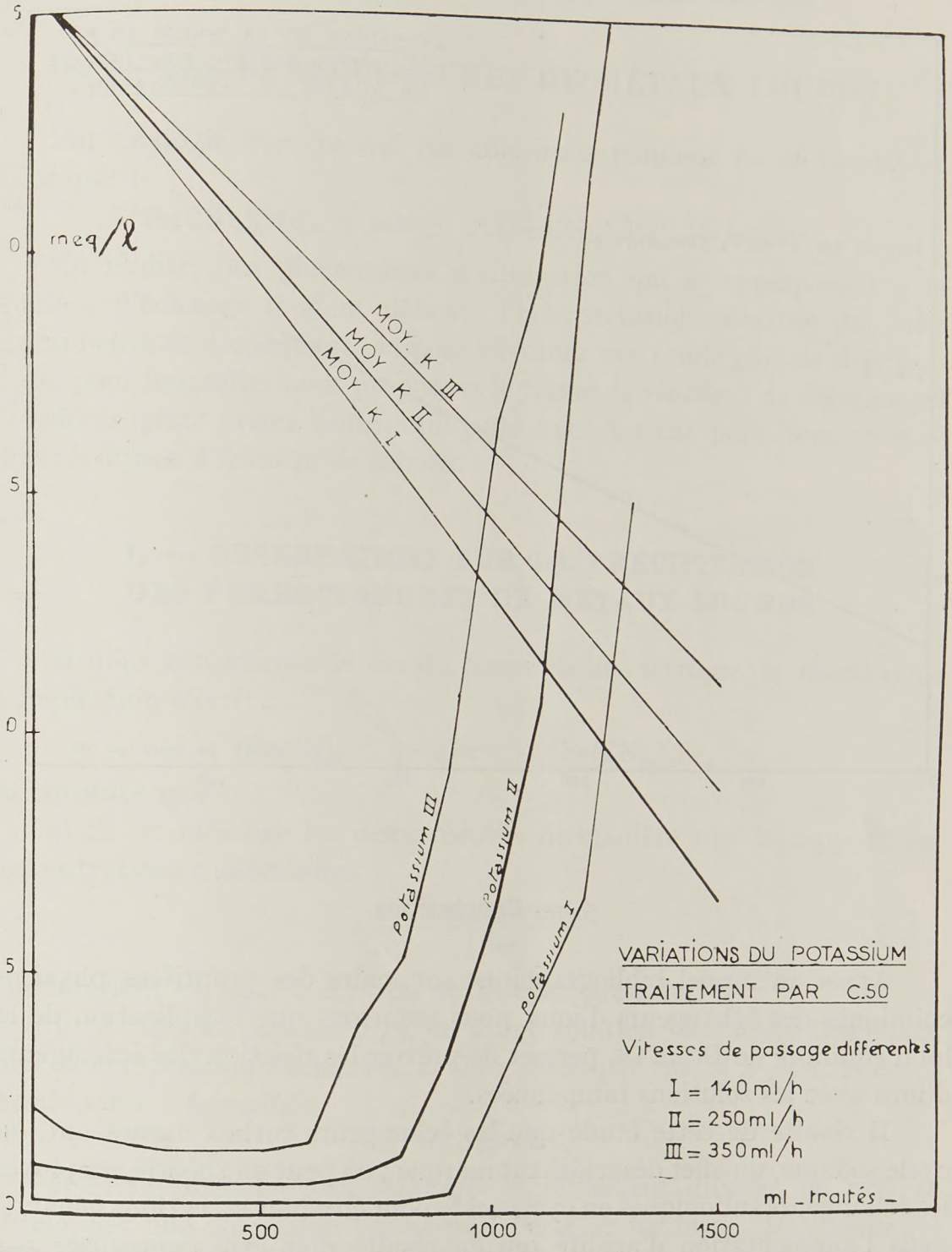


FIG. 5.

On peut extrapoler ; pour une vitesse nulle, la droite de la figure 6 coupe l'axe des ordonnées (teneur en K de la solution) en un point qui correspond exactement à la teneur que présente le liquide lorsqu'on le met en contact avec la résine et qu'on laisse l'équilibre s'établir ; effec-

tivement, 1 450 ml de ce vin synthétique, laissés pendant quelques heures en présence de 20 g de DOWEX 50 en cycle sodique, contenaient 3,5 méq de potassium par litre au lieu de 3,4 prévus par l'extrapolation.

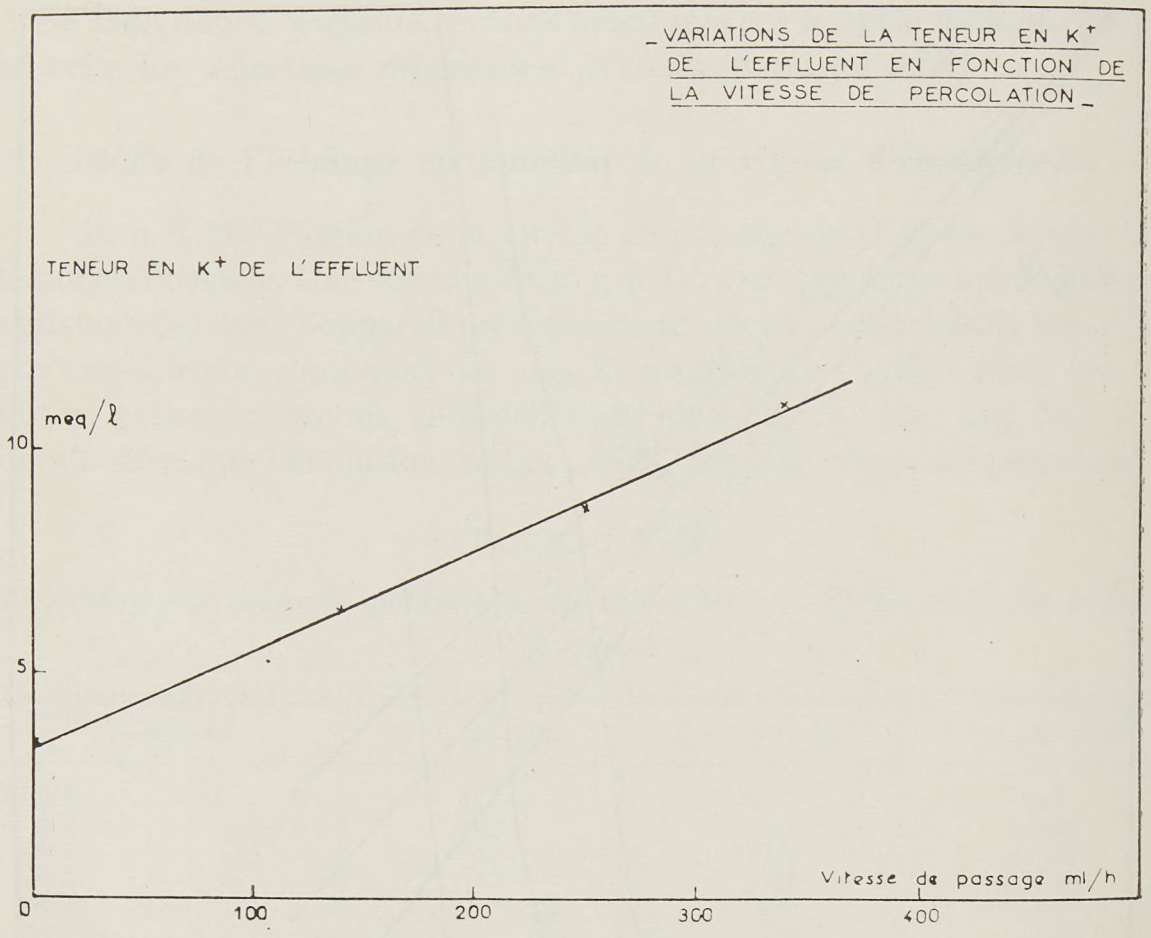


FIG. 6.

5. — **Conclusions.**

Après un rappel bibliographique sommaire des propriétés physico-chimiques des échangeurs d'ions, nous montrons que l'application de la loi d'équilibre de DONNAN, permet de prévoir les réaction des échangeurs d'ions avec les solutions tamponnées.

Il résulte de cette étude que les échangeurs carboxyliques ont, en cycle sodique, un effet désacidifiant marqué ; on peut en théorie, employer les échangeurs sulfoniques en cycle acide pour éliminer les cations gênants, mais l'augmentation d'acidité qui en résulte doit être compensée par l'utilisation d'échangeurs d'anions, produits à notre avis non adaptés au traitement de produits alimentaires.

En cycle sodique, les échangeurs sulfonés peuvent éviter les précipitations de bitartratre de potassium ; il est possible de pallier la diminution trop considérable en magnésium en utilisant soit des échangeurs régénérés en cycle mixte sodico-magnésien, soit en employant successive-

ment deux colonnes de résine ; l'une en cycle sodique pur, l'autre en cycle magnésien pur.

L'enrichissement en magnésium ne présente aucun danger pour la tenue du vin. Par ailleurs, ce cation est dépourvu de toxicité.

B. — LES FERROCYANURES DE MÉTAUX LOURDS

Par analogie avec ce qui précède, nous pouvons écrire l'équation théorique :

$$[Fe(CN)_6]_n Me'_m + m Me^{m+} \rightleftarrows [Fe(CN)_6]_n Me'_m + m Me^{m+}$$

En réalité, des phénomènes d'adsorption qui se superposent à la réaction d'échange rendent délicate l'interprétation détaillée des faits expérimentaux. Cependant, on peut effectuer une étude globale des réactions, pour lesquelles nous proposons le terme de *réactions de déplacement de cations* pour éviter toute ambiguïté avec les cas parfaitement stœchiométriques d'*échange de cations*.

I. — OBSERVATIONS SUR LA PRÉCIPITATION DES FERROCYANURES DE MÉTAUX LOURDS

Si nous considérons le cas du ferrocyanure ferrique, la réaction de précipitation s'écrit :

$$3Fe(CN)_6^{----} + 4Fe^{+++} \rightarrow [Fe(CN)_6]_3Fe_4$$

on constate que :

a) Si on mélange les deux réactifs de manière que le rapport des concentrations moléculaires

$$x = \frac{[\text{Ferrocyanure}]}{[\text{Fer}]}$$

soit inférieur ou égal à 0,75 on obtient un précipité.

Si ce rapport dépasse 0,75, on a une solution bleu foncé colloïdale, dont la composition varie avec x. On a démontré que si $x = 1$, le corps formé a pour formule :

$$[Fe(CN)_6FeK]$$

b) Si on mélange des solutions extrêmement diluées, on voit se développer une coloration jaune, puis verte, enfin bleue. DAVIDSON (7) a interprété cette phase de la réaction en admettant l'existence d'un équilibre d'oxydo-réduction :

$$Fe(CN)_6^{----} + Fe^{+++} \rightleftarrows Fe(CN)_6^{----} + Fe^{++}$$

dont la constante serait voisine de 10^5. L'équilibre tend à se déplacer vers la droite. Ceci expliquerait qu'un gros excès d'ions Fe^{3+} ralentit la réaction, et démontrerait l'identité du ferrocyanure ferrique et du ferri-

cyanure ferreux. Ces conclusions sont contraires à l'opinion de SCHAEPPI et TREADWELL (8).

Actuellement on considère comme fort probable l'existence d'un ion complexe $(Fe\ [CN)_6\ Fe]^+$ qui présente plusieurs configurations possibles. L'ion ferrique ayant un indice de coordinance égal à 6 et les groupes CN^- pouvant se lier par coordinance de l'azote, DAVIDSON a été conduit à penser qu'un ion ferrocyanure pouvait se lier à un ion Fe^{3+} par une, deux ou trois valences, les valences nécessaires pour saturer l'ion ferrique étant fournies respectivement par six, trois ou deux ions ferrocyanhydriques. Ces structures peuvent être en résonance. EMELEUS et ANDERSON ont admis la résonance entre les deux formes :

$$[Fe^{2+}(CN)_6Fe^{3+}]^- \rightarrow [Fe^{3+}(CN)_6Fe^{2+}]^-$$

et expliquent par là la coloration du composé (9). MCBAIN (10) a montré que la loi de VON WEIMARN peut s'appliquer à la réaction.

La structure très divisée du précipité favorise les réactions d'adsorption, et DUCLAUX (11) a mis en évidence que le ferrocyanure de cuivre précipité contient, non seulement du cuivre en excès, mais également des traces de cation alcalin et de l'anion qui salifiait le cuivre. La plupart des ferrocyanures de métaux lourds restent en suspension colloïdale s'ils ne contiennent pas *un peu plus* que la quantité théorique de cation ; BRITTON et DODDS (12) ont montré, par analyse conductimétrique, que seul le ferrocyanure de plomb se comporte comme le laisse prévoir l'équation de précipitation.

Les essais suivants tentent de mettre en évidence l'influence d'un certain nombre de paramètres sur la composition du ferrocyanure ferrique.

1. — Influence de la concentration des solutions.

Pour un rapport $x = \dfrac{[\text{Ferrocyanure}]}{[\text{Fer}]}$ constant et égal à 0,187, on a fait varier la concentration des solutions. On constate que l'adsorption du fer croît avec la dilution.

TABLEAU IX

Influence de la concentration des solutions sur la composition du gel de ferrocyanure ferrique.

Concentration en fer de la solution	Concentration en ferrocyanure	Fer restant théoriquement en solution	Fer trouvé en solution	Formule du précipité $[Fe\ (CN)\ 6]_3$
8.10^{-2} M/l	$1{,}5.10^{-2}$ M/l	6.10^{-2} M/l	$5{,}9\ .10^{-2}$ M/l	Fe 4,2
$3{,}2.10^{-2}$ M/l	$0{,}6.10^{-2}$ M/l	$2{,}4.10^{-2}$ M/l	$2{,}3\ .10^{-2}$ M/l	Fe 4,55
$1{,}6.10^{-2}$ M/l	3.10^{-3} M/l	$1{,}2.10^{-3}$ M/l	$1{,}19.10^{-2}$ M/l	Fe 4,1
8.10^{-3} M/l	$1{,}5.10^{-3}$ M/l	6.10^{-3} M/l	$5{,}3\ .10^{-3}$ M/l	Fe 5,4
$3{,}2.10^{-3}$ M/l	$0'6.10^{-3}$ M/l	$2{,}4.10^{-3}$ M/l	$1{,}9\ .10^{-3}$ M/l	Fe 6,4
$1{,}6.10^{-3}$ M/l	3.10^{-4} M/l	$1{,}2.10^{-3}$ M/l	$0.84.10^{-3}$ M/l	Fe 7,6
8.10^{-4} M/l	$1{,}5.10^{-4}$ M/l	6.10^{-4} M/l	$3{,}2\ .10^{-4}$ M/l	Fe 9,6
$3{,}2.10^{-4}$ M/l	$0{,}6.10^{-4}$ M/l	$2{,}4.10^{-4}$ M/l	$1{,}7\ .10^{-4}$ M/l	Fe 7,9

2. — Influence du temps de contact avec les eaux-mères.

On constate que la fixation du fer augmente avec le temps de contact solution-précipité.

TABLEAU X

Fixation du fer par le ferrocyanure ferrique. Influence du temps.

Solution 8.10^{-4} M/l de fer $1{,}5.10^{-4}$ M/l en ferrocyanure.

Fer théorique en solution	6.10^{-4} M/l
Fer en solution après 1 heure 30'	$3{,}8.10^{-4}$ M/l
» » » 18 heures	$3{,}2.10^{-4}$ M/l
» » » 3 jours	$1{,}1.10^{-4}$ M/l
» » » 7 jours	$0{,}9.10^{-4}$ M/l

La réaction est lente. Le précipité, colloïde négatif, adsorbe les ions Fe^{3+}. On peut penser que si on flocule rapidement le ferrocyanure, l'adsorption sera beaucoup plus faible. En effet, en ajoutant quelques milligrammes de colle de poisson, la floculation a été plus rapide et l'adsorption du fer fortement réduite ; en effet on a obtenu les résultats suivants :

TABLEAU XI

Effet d'un colloïde électropositif dans la solution sur la fixation du fer.

Résultats en 10^{-4} M/l de fer.

Fer théoriquement en solution s'il n'y avait pas adsorption	Sans colloïde	Fer en solution avec colloïde
0	0	0
2'5	0,25	1,8
5	1,25	3,13
7,5	2,5	5,0
10	3,7	6,8

3. — Remarques diverses.

On peut penser que l'adsorption du fer dépend beaucoup de la manière dont on mélange les réactifs.

Par exemple, si on ajoute rapidement la solution de fer au ferrocyanure, on trouve que le précipité contient du ferrocyanure en excès. On peut penser que des molécules de ferrocyanure sont retenues mécaniquement par le réseau de ferrocyanure ferrique qui se forme ; elles ne peuvent plus diffuser librement, peut-être parce que la pression de l'intérieur du réseau est insuffisante pour vaincre la force osmotique ; ceci est d'autant plus net que les solutions sont plus concentrées.

On peut obtenir la libre diffusion des ions les uns vers les autres en superposant délicatement quelques ml de $(NO_3)_3$ Fe M /100 et quelques ml de ferrocyanure de potassium M /100 séparés par une couche d'eau distillée. Au bout de quelques jours, la diffusion complète a eu lieu ; on constate alors que le précipité présente la composition théorique.

4. — Influence de l'acidité sur la fixation du fer.

On a étudié l'influence de l'acidité et de l'excès de fer sur la composition des précipités.

La courbe 7 montre, pour différentes quantités excédentaires de fer,

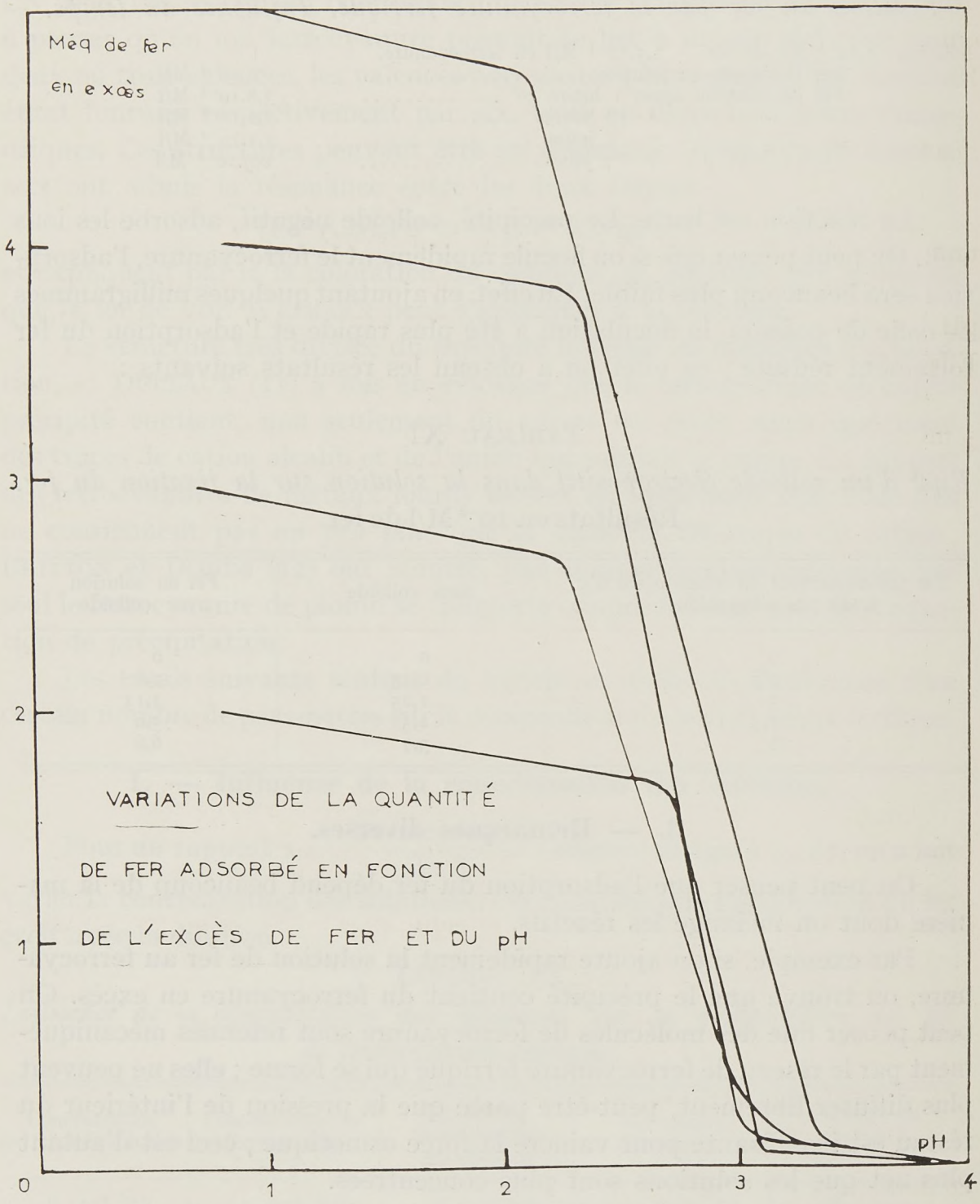


FIG. 7.

l'importance de la fixation du fer en fonction du pH. Plus les courbes s'éloignent des horizontales d'ordonnées 2.10^{-3} M/l, $3\text{-}10^{-3}$ M/l, etc., plus la fixation du fer est importante.

On voit que le précipité n'absorbe pas le fer pour des pH de précipitation inférieurs à 0,7 environ. Cependant le ferrocyanure ferrique est parfaitement précipité.

La zone d'expérimentation est d'ailleurs assez réduite ; vers pH 2,5-2,8 environ, l'hydroxyde ferrique commence à précipiter, et la précipitation est complète à pH 4 environ. Sans doute, le ferrocyanure ferrique, qui a besoin, pour précipiter, d'être floculé par un cation, fixe des ions H^+ entre pH 0,7 et pH 2,2.

Autrement dit, on admet qu'entre ces valeurs de pH se produit une réaction du type :

$$(\text{Ferro Fe})\,\text{Fe} + H^+ \rightleftarrows (\text{Ferro Fe})H + \frac{Fe^{3+}}{3}$$

uniquement à la surface du précipité (adsorption hydrolytique).

Si cette hypothèse est vraie, on devrait constater un élèvement du pH lorsque l'on place du ferrocyanure ferrique dans une solution acide. Effectivement, on réalise l'expérience suivante :

On amène à 100 ml un mélange de 2 ml de ferrocyanure M/100 et de 5 ml d'alun de fer M/100. On acidifie par une goutte de SO_4H_2 dilué.

On observe alors les variations suivantes de pH :

TABLEAU XII

Eau distillée	pH 5,6
Après addition d'acide	pH 1,7
Après addition du ferro	pH 1,7
Après addition du fer	pH 1,75
Après agitation, puis 5' de repos	pH 1,75
Après 10' de repos	pH 1,8
Après 50' de repos	pH 1,8
Après 5 heures de repos	pH 1,9
Après 24 heures de repos	pH 2,1
A ce moment on agite et remet le précipité en suspension	pH 1,7

On doit admettre qu'une partie des ions H^+ ont été fixés par le ferrocyanure et qu'ils sont retenus au voisinage des particules du précipité. L'agitation rompt les forces de liaison et les ions H^+ sont répartis dans la solution, donc le pH baisse. Ce phénomène a été signalé par BAUMAN (13) ; lorsqu'on met en suspension dans l'eau un échangeur de cations, les variations de pH sont beaucoup plus importantes, mais le phénomène semble absolument analogue.

II. — DÉCOMPOSITION DES SELS PAR LES BASES

Soit un sel très peu soluble dans l'eau, décomposable par une base en donnant un hydroxyde très peu soluble. On peut calculer le produit de solubilité du sel si on connaît celui de l'hydroxyde. On a les réactions :

(1) $\quad Me^{n+} + n OH^- \rightleftarrows Me(OH)_n$ avec $S_{hyd} = [Me^{n+}][OH^-]^n$

(2) $\quad mMe^{n+} + nX^{m-} \rightleftarrows Me_mX_n$ avec $S_{sel} = [Me^{n+}]^m[X^{m-}]^n$

(3) $\quad Me_mX_n + nmOH^- \rightleftarrows mMe(OH)_n + nX^{m-}$

dont la constante d'équilibre est :

$$K = \frac{[Me(OH)_n]^m[X^{m-}]^n}{[Me_mX_n][OH^-]^{n\cdot m}}$$

Si le sel et l'hydroxyde sont suffisamment insolubles, on peut écrire :

$$K' = \frac{[X^{m-}]^n}{[OH^-]^{n\cdot m}} = \frac{S_{sel}}{S_{hyd}^{\ m}}$$

d'où on tire le produit de solubilité du sel :

(A) $$\log S_{sel} = n\log[X^{m-}] + m\log S_{hyd} + 14nm - nm\text{pH}$$

Cette équation générale est vérifiée chaque fois que coexistent le sel, l'hydroxyde et l'anion, à condition que l'équilibre soit établi.

Par une mesure de pH et le dosage de l'anion, on peut donc calculer le produit de solubilité d'un sel si on connaît celui de l'hydroxyde et inversement.

Cette méthode donne de très bons résultats, par exemple avec le chlorure d'argent, l'iodure de plomb, pour lesquels les produits de solubilité mesurés sont tout à fait conformes à ceux trouvés par conductimétrie.

Cas des ferrocyanures.

Considérons le ferrocyanure de plomb :

$$[Pb^{++}][OH^-]^2 = 10^{-15,6}$$

L'équation de décomposition est :

$$Fe(CN)_6Pb_2 + 4\ OH^- \rightleftarrows Fe(CN)_6^{----} + 2Pb(OH)_2$$

avec $$K' = \frac{(Fe(CN)_6^{----})}{[OH^-]^4} = \frac{S_{FERRO}}{10^{-31,2}}$$

ou, tous calculs faits,

$$\log S_{Ferro} = 24,8 - 4\text{pH} + \log[Fe(CN)_6^{----}]$$

Expérimentalement, on a trouvé :

$$\log S_{Ferro\ Pb} = -14,2$$

La conductimétrie nous a donné :

$$\log S_{Ferro\ Pb} = -15,1$$

La concordance est assez bonne.

De la même manière on a mesuré :

	Décomposition	Conductimétrie
$Fe(CN)_6Ag_4$.....	$\log S = -22,1$	$\log S = -25,2$
$Fe(CN)_6Cu_2$.....	$\log S = -20,9$	$\log S = -19,6$

Cas du ferrocyanure ferrique.

La courbe (fig. 8) montre la variation du pH d'une suspension $1{,}5.10^{-3}$ M/l de ferrocyanure ferrique lorsqu'on lui ajoute lentement, à raison de 0,4 ml/heure une solution de soude N.

La première vague (portion A B de la courbe) correspond à la neutralisation de l'acidité libre de la solution. Au point B commence la décomposition du ferrocyanure qui se poursuit jusqu'en C. A ce moment, tout

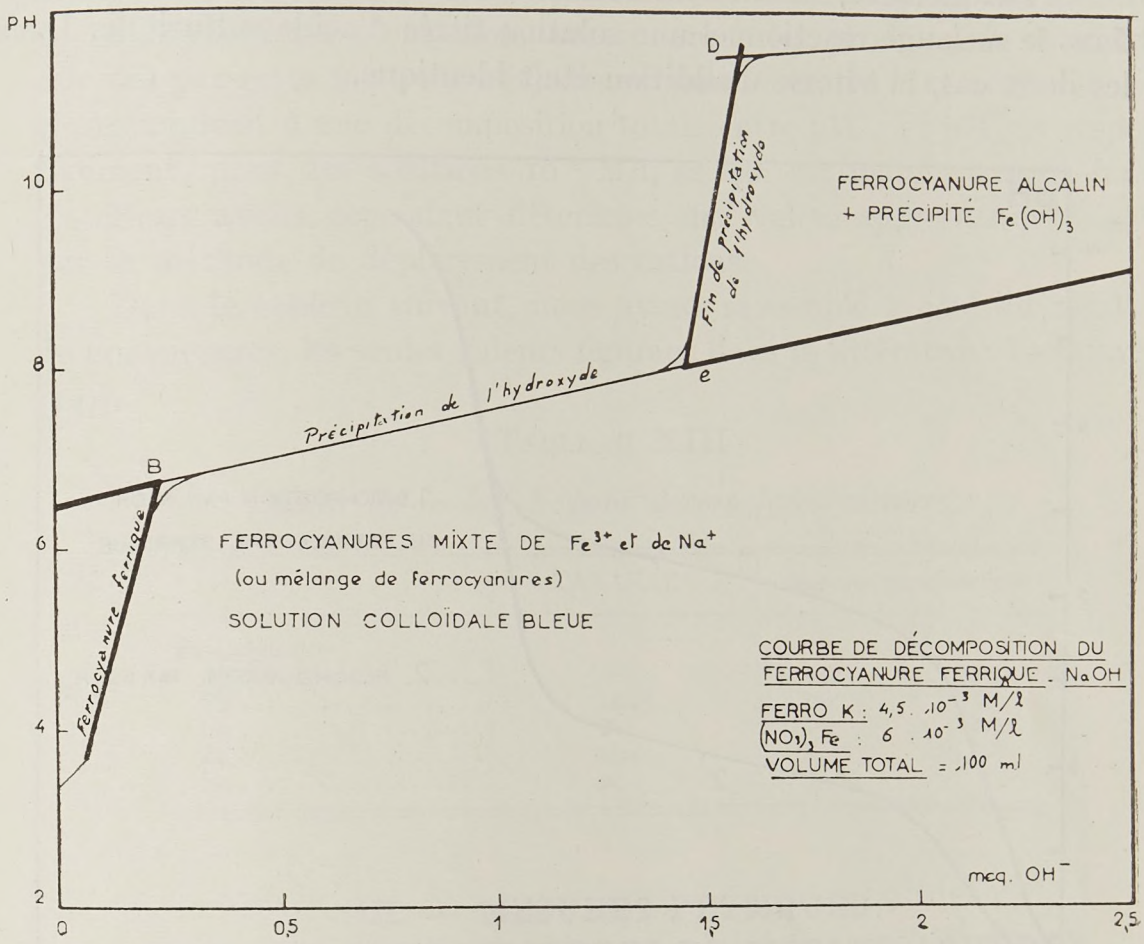


FIG. 8.

le ferrocyanure est décomposé et une seule goutte de soude en excès fait monter le pH jusqu'au-dessus de 11.

Si en chaque point de B C l'équilibre est établi, la relation précédente donne, tous calculs faits, et en prenant $S_{hyd} = 10^{-37}$

$$\log S_{Ferro\ Fe} = 20 + 3 \log [Fe(CN)_6^{----}] - 12\ pH$$

Or, les mesures conduisent à des valeurs assez divergentes s'étalant entre 10^{-50} et $10^{-34,5}$. Ceci conduit à admettre que l'équilibre n'est pas établi. D'autre part, dès que la décomposition commence, la solution colloïdale de ferrocyanure mixte de fer et de sodium ne correspond plus à une espèce chimique définie, le fer non précipité est engagé dans un com-

plexe dont la composition varie avec la quantité de soude ajoutée, qu'on peut formuler symboliquement par :

$$[Fe(CN)_6]Fe_{3(4-X)}Na_X$$

Sur un même diagramme (fig. 9), on a enregistré les courbes correspondant aux réactions :

(1) $[Fe(CN)_6]_3Fe_4 + 12\ OH^- \rightleftarrows 3Fe(CN)_6^{----} + 4\ Fe(OH)_3$

(2) $[Fe(CN)_6]^{----} + 4\ Fe(OH)_3 + 6SO_4H_2 \rightleftarrows [Fe(CN)_6]_3Fe_4 + 12\ H_2O + 6\ SO_4^{--}$

Pratiquement, aussitôt tracée la courbe de décomposition, on versait dans le mélange réactionnel une solution titrée d'acide sulfurique. Dans les deux cas, la vitesse d'addition était identique.

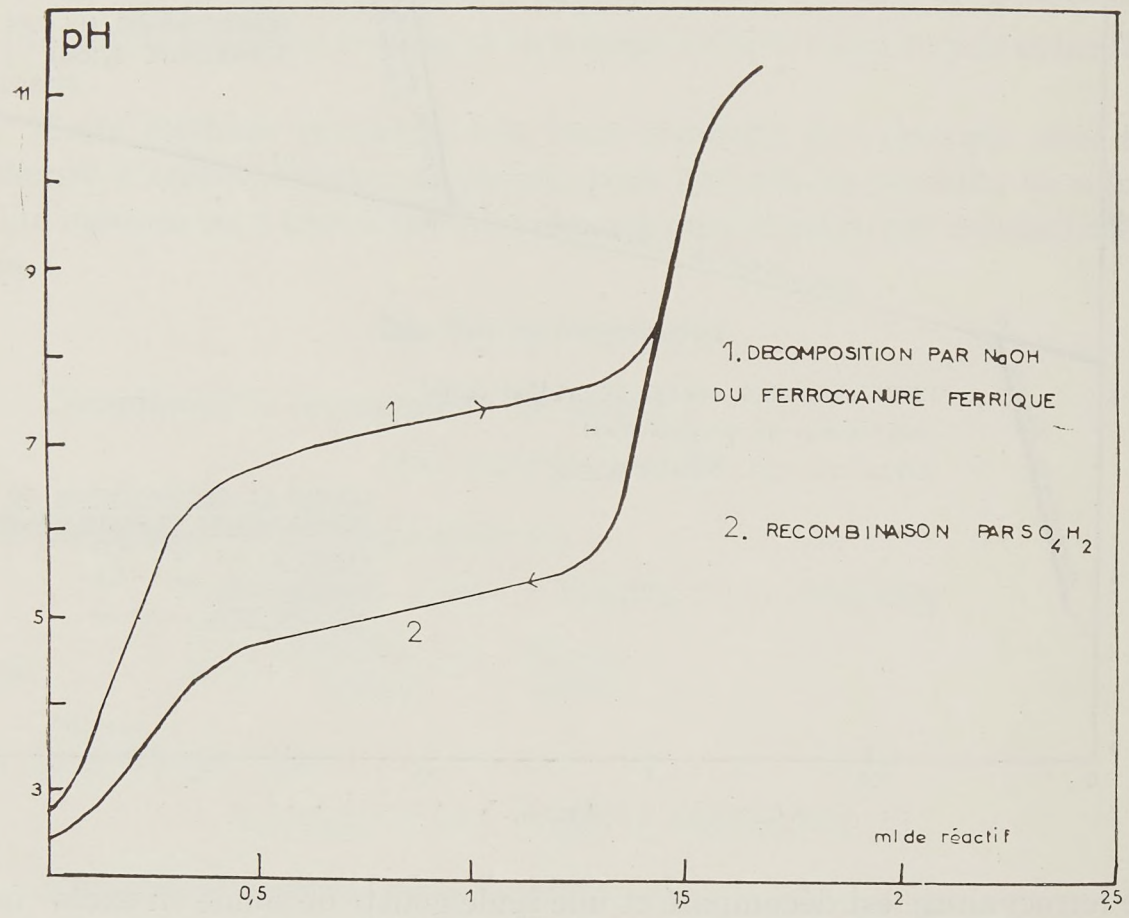


FIG. 9.

Si la réaction était en équilibre en chaque point, les deux courbes pH = f (volume de réactif) devraient se recouvrir. En réalité, elles sont assez distinctes l'une de l'autre et constituent un véritable cycle d'hystérésis. On constate que les deux courbes se rapprochent lorsque la vitesse d'addition des réactifs diminue.

D'autre part, la réaction n'est pas thermodynamiquement réversible. On constate en effet, que lorsque la réaction (2) est terminée, la suspension de ferrocyanure ferrique présente un aspect très différent de celui

de la solution initiale : le ferrocyanure ainsi reprécipité présente un dichroïsme bleu-rouge et semble beaucoup plus dispersé. Sa structure macroscopique a nettement changé et il est probable que la solubilité de cette nouvelle forme physique n'est pas la même que celle du produit initial.

En fait, on mesure sur la courbe des produits de solubilité très différents ; nous devons conclure que dans le cas présent, la méthode est en échec.

La détermination conductimétrique est également impraticable ; si on lave du ferrocyanure ferrique précipité, il se transforme en une solution colloïdale dès qu'il est débarrassé des ions étrangers. Les mesures de conductimétrie n'ont alors aucun sens : les produits de solubilité calculés par cette méthode s'échelonneraient entre 10^{-11} et 10^{-30}. Or ceci correspondrait à une décomposition totale entre pH 2 et pH 3,5 respectivement, pour des solutions 10^{-3} M/l, ce qui est manifestement faux.

Nous avons cependant déterminé une valeur *approchée* de $S_{Ferro\ Fe}$ par la méthode de déplacement des cations.

Dans le tableau suivant, nous avons rassemblé à côté du résultat de nos mesures, les seules valeurs figurant dans la littérature (TANANAEV (14)).

TABLEAU XIII

Valeur de — log S pour divers ferrocyanures.

	TANANAEV	Mesures personnelles
Ferrocyanure		
Ag	—	22,1 à 25,5
Pb	14,45	14,2 15,1
Cu	16	19,9 20,9
Zn	15,4	12,7
Fe	40	55,6

III. — MESURES PHYSIQUES SUR LES FERROCYANURES DE MÉTAUX LOURDS

SPECTRES DE RAYONS X

Les spectres DEBYE et SCHERRER sont peu caractéristiques. Les anneaux sont flous et peu nombreux ; on peut penser que la maille, cubique, a une arrête de 5,2 Å environ, c'est la valeur trouvée par KEGGINS et MILES (15).

ÉTUDE THERMOGRAVIMÉTRIQUE

Une étude thermogravimétrique de ferrocyanures précipités n'a pas permis de mettre en évidence l'existence éventuelle d'un hydrate et nous ne croyons pas devoir reporter ces essais dont la conclusion est somme toute négative.

IV. — RÉACTIONS DE DÉPLACEMENT DE CATIONS

a) Expériences qualitatives.

Si on ajoute du nitrate d'argent à une suspension de ferrocyanure de cuivre ou de fer, on voit le précipité se décolorer ; l'analyse montre que la solution contient du fer ou du cuivre : il y a eu *déplacement* de cations. Nous avons précédemment justifié ce terme. Vorontsov (16) a classé les ferrocyanures lourds en série de solubilité décroissante, et en se basant qualitativement sur le critère suivant : on dira qu'un cation A donne un ferrocyanure moins soluble qu'un cation B, si une solution de A, ajoutée au ferrocyanure de B, fait passer ce dernier en solution. Voronstov a pu établir la classification suivante :

$$Pb < Al < Bi < Sb < Mn < Cd < Co < Ni < Fe^{2+} < Zn < Fe^{3+} < Cu < Ag$$

le ferrocyanure d'argent étant le moins soluble.

Nous avons incidemment remarqué que cette série correspond assez fidèlement à la série des rayons ioniques croissants ; la solubilité diminue lorsque le rayon ionique augmente.

b) Expériences quantitatives.

Théorie de la réaction d'échange de deux cations. — Soient deux cations A^{++} et B^{++} pouvant donner avec l'anion X des sels insolubles. Nous avons la réaction :

$$\underset{\downarrow}{X_2A} + B^{++} \rightleftarrows X_2B + A^{++}$$

avec

$$K' = \frac{[A^{++}]}{[B^{++}]} = \frac{S_{X_2A}}{S_{X_2B}}$$

d'où, si on connaît S_{X_2B}

$$\text{(B)} \qquad \text{Log } S_{X_2A} = \log S_{X_2B} + \log [A^{++}] - \log [B^{++}]$$

Nous avons pu vérifier cette relation sur un certain nombre de systèmes avec une précision rigoureuse.

Cas des ferrocyanures. — A cause des phénomènes d'adsorption, la précision est ici plus faible. La moyenne d'un grand nombre de déterminations nous permet de penser que l'erreur relative est de l'ordre de 10 p. 100 environ, de sorte que nous aurons par exemple

$$\log S_{\text{Ferro Cu}} = 19.9 \pm 2$$

Cette imprécision est pratiquement impossible à éviter à cause de la nature même des produits étudiés. Il faut donc considérer les résultats obtenus comme un ordre de grandeur ; l'intérêt de ces déterminations

est de comparer entre eux les divers ferrocyanures en ce qui concerne leur solubilité.

Résultats. — Soit la réaction :

$$Fe(CN)_6Me_2 + Me'^{2+} \rightleftarrows Fe(CN)_6Me'_2 + 2Me^{2+}$$

on prépare des solutions contenant n mM/l du cation Me'^{2+}, auxquelles on ajoute des quantités telles de $Fe(CN)_6Me_2$ dont le produit de solubilité est connu, qu'on encadre largement le point équivalent de la solution. On amène au même volume et laisse l'équilibre s'établir pendant plusieurs jours, en maintenant les échantillons à la même température. On centrifuge, puis dose les cations Me et Me' dans la solution. On calcule ensuite la constante d'équilibre ; on en tire le produit de solubilité du ferrocyanure $Fe(CN)_6Me'_2$.

On a ainsi étudié un certain nombre d'équilibres ; les résultats sont rassemblés dans le tableau suivant.

TABLEAU XIV

Constantes d'équilibre et produits de solubilité de quelques ferrocyanures peu solubles.

Système étudié	Constante d'équilibre	S_{Ferro} calculé
$Fe(CN)_6\ Pb_2/Zn^{++}$	$4 \cdot 10^{-3}$	$2 \cdot 10^{-13}$
$Fe(CN)_6\ Pb_2/Cu^{++}$	$3{,}1$	$2{,}5 \cdot 10^{-17}$
$Fe(CN)_6\ Cu_2/Ag^{+}$	$2{,}5 \cdot 10^{-3}$	10^{-20}

Calcul du produit de solubilité du ferrocyanure ferrique à partir de la réaction d'échange et du pH de décomposition de ce sel par la soude.

Nous avons la réaction

$$[Fe(CN)_6]_3Fe_4 + 6\,Cu^{++} \rightleftarrows 3\,Fe(CN)_6Cu_2 + 4\,Fe^{3+}$$

avec

$$K' = \frac{S_{Ferro\ Fe}}{(S_{Ferro\ Cu})^3} = \frac{[Fe^{3+}]^4}{[Cu^{2+}]^6}$$

$$\text{ou } \log S_{Ferro\ Fe} = 3 \log S_{Ferro\ Cu} + 4 \log [Fe^{3+}] - 6 \log [Cu^{++}]$$

Une série d'expériences nous a donné comme valeur moyenne :

$$\log S_{Ferro\ Fe} = -55{,}6$$

A partir de cette valeur, on peut calculer le pH de décomposition par la soude. De la relation (B) on tire :

(C) $$pH = \frac{168 - 92{,}4 + 3 \log[Fe(CN)_6^{---}]}{12} = 5{,}8 \text{ à } 6$$

en solution $\neq 4{,}5 \cdot 10^{-3}$ M en ferrocyanure.

Il résulte de ces essais que le produit de solubilité du ferrocyanure ferrique, assez difficile à déterminer avec précision, se situe aux environs de 10^{-55}, donc sensiblement plus élevé que celui déterminé par TANANAEV.

Cinétique d'une réaction de déplacement. — On a étudié expérimentalement en fonction du temps la variation de la concentration en cuivre, lorsqu'on agite une solution de SO_4Cu avec du ferrocyanure ferrique.

La courbe obtenue a une allure classique ; l'équilibre des ions est atteint au bout de 3 heures environ. Avec les quelques valeurs mesurées, il n'est pas possible de déterminer expérimentalement l'ordre de la réaction.

Influence du pH. — Des essais nous ont montré que la limite atteinte par la réaction de déplacement n'est pas influencée par le pH entre 1,5 et 3,5.

V. — EMPLOI DU FERROCYANURE FERRIQUE EN PHASE FIXE

La réaction du ferrocyanure ferrique avec la plupart des cations lourds n'est pas rigoureusement quantitative, sauf avec l'argent. Si on veut enlever complètement un cation donné au moyen d'une réaction de déplacement, on peut envisager deux procédés :

a) Utiliser un très gros excès de ferrocyanure.

b) Epuiser méthodiquement le ferro au moyen d'une percolation.

Cette dernière manière d'opérer est semblable à celle qu'on applique pour traiter rationnellement des liquides par les échangeurs d'ions.

Mais le ferrocyanure ferrique, à cause de sa nature colloïdale, colmate rapidement et de façon complète tous les filtres habituels. Il est donc nécessaire de le fixer sur un support chimiquement inerte, de telle manière qu'il conserve ses propriétés de déplacement, et qu'il acquière une porosité suffisante pour rendre possible les filtrations. Différents essais de fixation sur amiante, laine de verre, etc ,ont échoué ; nous avons ainsi acquis la certitude qu'une fixation *mécanique* sur un quelconque support est impraticable ; nous devons au contraire profiter de ses propriétés colloïdales pour le fixer par *adsorption* sur un autre colloïde.

D'assez longues recherches nous ont permis de mettre au point un « complexe ferrocyanure ferrique — terre d'infusoires » dans lequel les deux éléments sont intimement liés et non dissociables par analyse immédiate (17).

Les terres d'infusoires sont composées de résidus fossiles, squelettes microscopiques de diatomées ayant fixé de la silice. Leur origine animale leur confère une structure organisée et une surface énorme par unité de volume. Elles sont utilisées depuis longtemps pour diverses applications

industrielles (filtrations de toute nature) et scientifiques (chromatographie).

Les variétés connues sous le nom commercial de « Célites » proviennent du gisement de White Hills aux Etats-Unis. Il existe 9 types courants de célites, de porosités variées parmi lesquelles nous avons choisi « Filter Cel », « Hyflo Super-Cel » et « Standard Super-Cel ».

La teneur en silice est de l'ordre de 85-95 p. 100 suivant les types ; on admet qu'une partie de cette silice est susceptible de s'hydrater en donnant naissance à une solution colloïdale. Ceci est assez net lorsqu'on met en suspension une célite dans de l'eau distillée : après dépôt des particules les plus lourdes, la phase surnageante reste trouble pendant très longtemps et présente l'effet Tyndall. L'addition d'un cation lourd ou d'un acide flocule rapidement la solution.

1. — Les célites.

a) Fixation de cations par les célites.

On met en suspension des prises de 1 g de Filter Cel dans l'eau distillée. On ajoute des quantités croissantes de $(NO_3)_3Fe$ (entre 4 et 36. 10^{-5} M/l) et on complète à 100 ml.

Après agitation et repos, on dose le fer en solution par colorimétrie au moyen de l'orthophénanthroline.

Tableau XV

Résultats en 10^{-5} *M/litre.*

Fer introduit	Fer fixé
—	—
4	1,2
8	5,2
16	6
24	5,8
32	4,4
36	4,2

On trouve que la fixation du fer présente un maximum à la concentration de 16 . 10^{-5} M/litre.

Nous pensons que ceci peut s'expliquer par les hypothèses suivantes :

1. — Pour des teneurs inférieures au maximum, l'adsorption s'effectue régulièrement, sans doute suivant l'une des lois classiques de l'adsorption (Isotherme de Freundlich ou de Langmuir).

2. — Dans une deuxième phase, la coagulation du colloïde par la solution se fait en flocons de plus en plus gros à mesure que la concentration en fer augmente (ceci est vérifié par des essais de sédimentation). Les particules, absorbant les ions sur leur surface externe, sont d'autant moins adsorbantes que leur taille est plus importante. Donc, à partir d'un certain moment, l'adsorption décroît.

Nous avons constaté que le pouvoir adsorbant de différents kieselguhrs et célites du commerce varie entre 4.10^{-6} et 10^{-5} M de fer par gramme. Ce fer peut être enlevé par un acide ou bien déplacé par un autre cation tel que le cuivre.

Donc le support choisi pour le ferrocyanure n'est pas chimiquement inerte et les propriétés de déplacement vont certainement se trouver modifiées.

b) **Floculation réciproque de la célite et du ferrocyanure ferrique.**

Si on traite une suspension de célite dans une solution de sel ferrique par du ferrocyanure de potassium de sorte qu'il reste du fer non précipité, on constate que le produit bleu qui se dépose contient du fer en excès, non éliminé par lavage à l'eau, mais déplaçable par un acide. Des essais minutieux nous ont conduit à admettre que la quantité de fer ainsi fixée n'est pas la somme de ce que fixeraient séparément la célite et le ferrocyanure ferrique dans les mêmes conditions. Ceci renforce bien l'hypothèse que célite et ferrocyanure sont mutuellement adsorbés, les sites encore libres pour l'adsorption pouvant ainsi seuls fixer du fer.

Les phénomènes sont encore compliqués par l'existence d'un maximum d'absorption pour la célite, comme l'essai suivant le met en évidence.

TABLEAU XVI

Fixation du fer { *— par filter-Cel* / *— par filter-Cel + ferrocyanure*

Les résultats sont exprimés en 10^{-5} *M par gramme de Célite.*

Fer introduit	Fer ↓ par ferro	Fer fixé par terre seule	Fer fixé par terre + ferro	Différence
4	reste du ferro en solution	1,2	—	—
8	8	5,2	trace	—
12	8	6	3,2	— 2,8
16	8	6	4,8	— 1,2
20	8	6,2	5,6	— 0,6
24	8	5,8	5,4	+ 0,4
28	8	5	6	+ 1
32	8	4,4	6,2	+ 1,8
36	8	4,2	6,0	+ 1,8

Conditions opératoires.

Dans 2 séries de 9 récipients on place 1 g de célite qu'on disperse dans un peu d'eau ; on ajoute des quantités de fer allant de 4.10^{-5} à 36.10^{-5} M. A l'une des séries on ajoute 6.10^{-5} M de ferrocyanure de potassium, non à l'autre. On complète à 100 ml. On agite 12 heures, puis après repos on dose le fer par colorimétrie.

2. — Réaction de déplacement de cations.

a) **Nous allons chercher les proportions** relatives de célite, de sel de fer et de ferrocyanure qui permettent de préparer le complexe filtrant présentant la meilleure efficacité de déplacement des ions cuivre.

α) Pour un poids donné de célite et une quantité donnée de ferrocyanure de potassium, on fait varier la teneur en fer. Le produit floculé obtenu est lavé à l'eau distillée jusqu'à élimination de tout le fer soluble ; on dépose sur un Buchner de 6 cm de diamètre et on fait passer sur ce filtre une solution contenant $1{,}2.10^{-4}$ M de cuivre et $\frac{M}{100}$ en chlorure de potassium.

On dose ensuite le cuivre par polarographie (voir la partie I).

Pour mieux faire ressortir les échanges stœchiométriques, les résultats du tableau suivant ont été calculés en 10^{-4} équivalents.

Tableau XVII

Influence de la quantité de fer sur l'élimination du cuivre.

Conditions : 5 g de célite + 2,4 × n 10^{-4} eq. de fer + 2,4. 10^{-4} eq. de ferro K. Traitement par $2{,}4.10^{-4}$ eq. de cuivre.

				A		
Fer introduit	2,4 + ε	4,8	7,2	9,6	12	24
Fer précipité par ferro	2,4	2,4	2,4	2,4	2,4	2,4
Fer absorbé	ε	1,9	2,75	3,1	3,6	3,9
Cuivre fixé	0,56	0,83	0,83	0,90	0,86	0,82

Cette expérience, parfaitement reproductible, laisse apparaître un net maximum pour l'absorption du cuivre, qui ne coïncide d'ailleurs pas avec le maximum de fixation du fer.

β) Se basant sur les données de l'essai précédent, nous avons fait varier le poids de célite. Par contre, le rapport $\frac{\text{Fer}}{\text{Ferrocyanure}}$ optimum de l'essai *α*) était conservé constant.

Il est évident que lorsque la quantité de célite augmente, la quantité de fer adsorbé est plus importante.

Tableau XVIII

Influence de la quantité de célite.

Conditions : Fer $9{,}6.10^{-4}$ eq. + Ferro : $2{,}4.10^{-4}$ eq. + célite : n grammes

			A	B	
Poids de filter cel	1	2	5	10	20,9
Fer absorbé par le complexe....	1,4	1,9	3,0	4,4	5,6
Cuivre fixé	0,55	0,77	0,92	1,08	1,65

Les expériences ci-dessus montrent que :

— l'adsorption du fer par le complexe augmente assez peu avec le poids de terre : elle est dans le rapport de 4 quand le poids de terre augmente de 20 fois.

— l'efficacité augmente avec le volume de la masse filtrante, mais assez peu.

Nous avons essayé d'appliquer les théories de l'adsorption pour interpréter les expériences ci-dessus. En fait, les paramètres sont si nombreux et si mal définis qu'aucun calcul n'a pu être mené à bien. D'ailleurs, les théories sur les adsorptions ioniques n'ont pratiquement pas reçu de solution générale, et il serait probablement prématuré de s'attaquer de prime abord à un système aussi complexe.

b) Inconvénients et remède.

Les sites d'adsorption du complexe sont saturés par des ions fer et toutes les réactions de déplacement conduisent à un enrichissement en fer de la solution, que celui-ci provienne de la celite ou du ferrocyanure.

Nous avons mis à profit les phénomènes d'adsorption des ions H^+ : si on lave le complexe avec une solution acide, on élimine une grande partie du fer adsorbé ; le passage d'une solution d'un sel de cuivre sur ce complexe produit une élimination parfaite du cuivre sans dissolution de fer.

On peu envisager le processus suivant : le cuivre s'échange sur le ferrocyanure ferrique qui libère une quantité équivalente de fer. Cet ion, bien plus adsorbable que l'ion H^+ est fixé par adsorption sur le complexe et reste à l'état insoluble ; les ions H^+ déplacés passent alors en solution.

Exemple

On prépare des filtres contenant 5 g de terre et $1{,}2.10^{-4}$ M de ferrocyanure ferrique ainsi qu'une quantité non déterminée de fer absorbé. Cette série de filtres est lavée à l'eau distillée. On traite $1{,}2.10^{-5}$ M de cuivre en solution dans 100 ml de KCl M/100. On compare en outre les résultats obtenus avec ce que produit l'agitation de la solution de cuivre avec la même quantité de ferrocyanure non mélangé à la celite.

Tableau XIX

Résultats en 10^{-5} *M.*

	Ferro lavé à l'eau		Ferro lavé à l'acide sulfurique	
	ferro + terre	Ferro pur	Ferro + terre	Ferro pur
	—	—	—	—
Cuivre fixé	11,5	1,6	11,5	1,6
Fer cédé	7,9	1,1	trace	0

Cette expérience est parfaitement reproductible. On voit que l'efficacité de déplacement ne se trouve pas altérée par le traitement à l'acide. Bien plus, d'autres essais ont montré que ce lavage peut augmenter le pouvoir d'élimination du cuivre. On peut supposer que l'acide enlève des cations qui existaient à l'état naturel dans la celite, augmentant le nombre de sites d'absorption disponibles.

On a transposé directement ces essais pour le traitement des vins. Les analyses des vins traités ont montré une excellente élimination des métaux lourds, sauf de l'aluminium qui n'est absolument pas touché.

c) Comparaison de l'efficacité du ferrocyanure de potassium et du ferrocyanure ferrique sur l'élimination des métaux lourds d'une solution.

On a préparé des solutions de concentrations variables en différents métaux lourds, mais telles que la somme des concentrations molaires partielles soit constante et égale à $8{,}2.10^{-3}$ M par litre.

Ces solutions ont été traitées

— soit par $7{,}5.10^{-3}$ M/l de ferrocyanure de K,

— soit par $7{,}5.10^{-3}$ M/l de ferrocyanure ferrique + 100 grammes de filter-cel, lavé par 100 ml SO_4H_2 N/10.

Les ions en solution ont été dosés par les méthodes polarographiques précédemment décrites ; le fer est déterminé par l'orthophénantroline.

On a obtenu les résultats suivants :

Tableau XX

Précipitation des métaux lourds par les ferrocyanures de fer et de potassium.

Résultats exprimés en 10^{-3} M/l(quantités précipitées).Le signe — indique un enrichissement en fer, le signe + une élimination.

Série I : Fer + Cuivre

Témoin		Ferro K		Ferro Fe	
Fe	Cu	Fe	Cu	Fe	Cu
—	—	—	—	—	—
1,2	6	0,60	5,18	— 0,2	3,75
2,4	4,8	1,8	4,24	+ 1,6	2,3
3,6	3,6	3,5	2,41	+ 2	1,95
4,8	2,4	4,4	2,4	+ 2,1	1,03
6,0	1,2	5,4	1,2	+ 4,8	0,7

Série II : Fer + Zinc

Fe	Zn	Fe	Zn	Fe	Zn
—	—	—	—	—	—
1,2	6	±	±	+ 0,4	4,4
2,4	4,8	±	±	+ 2	2,9
3,6	3,6	±	±	+ 3	1,8
4,8	2,4	1,4	1,4	+ 1,6	1,3
6,0	1,2	—	0,33	+ 4,7	0,4

Série III : Plomb + Zinc

Pb	Zn	Pb	Zn	Pb	Zn
—	—	—	—	—	—
1,2	6	0,65	5,2	1,2	4,5
2,4	4,8	2,4	3,1	1,3	3,6
3,6	3,6	±	±	3,2	3,6
4,8	2,4	±	±	3,5	1,7
6,0	1,2	±	±	4	0,5

Série IV : Fer + Cuivre + Zinc

Fe	Cu	Zn	Fe	Cu	Zn	Fe	Cu	Zn
—	—	—	—	—	—	—	—	—
4,8	1,2	1,2	4	0	0	+ ?	0	0
2,4	2,4	2,4	±	±	±	+ 2,3	0	0
1,2	2,4	3,6	±	±	±	+ 0,0	2,4	2,8
2,4	3,6	1,2	0	0	0,33	+ 1,8	2,2	1,17
3,6	2,4	1,2	3,4	0	0,2	+ 3	1,7	1,5

RÉSULTATS

1° Les croix ± indiquent les mélanges impossibles à clarifier par centrifugation et sur lesquels on n'a pu faire aucun dosage.

2° Le lavage acide a entraîné la majeure partie du fer soluble (ceci a été vérifié dans chaque filtrat) du produit filtrant.

3° Le produit élimine un peu de fer et présente une bonne efficacité sur les autres métaux lourds. L'action sur le cuivre est assez importante. Il convient de signaler que ces essais sont réalisés dans des conditions beaucoup plus difficiles que celles pour lesquelles le traitement a été étudié.

4° Dans aucun cas on n'assiste à la formation de sels infiltrables avec le ferro-ferrique, alors que le ferrocyanure de potassium forme parfois des ferrocyanures colloïdaux, spécialement en présence de zinc.

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

(1) Voir par exemple : OSBORN (G. H.). — Synthetic ion exchangers. Chapman and Hall, Londres 1955. — KUNIN (R.). — Ion exchange resins. Wiley and Sons, New York, 1958.
(2) GREGOR- (H. P.). J. A. C. S. — **70**, 1293, 1948. — *Ibid.*, **73**, 643, 1951.
(3) KERR (H. W.). — *J. Am. Soc. Agr.*, **20**, 309, 1928.
(4) GREGOR (H. P.) et BREGMAN (J. I.). — *J. Coll. Sci.*, **6**, 323, 1951.
(5) BONASTRE (J.) et CANO-MAROTTA (G.). — Communications *Soc. Sc. Phys. Bx*, 1957 et 1958.
(6) BETTIGNIES (G. DE). — *Bull. Soc. Chim. Fr.*, **20**, 28, 1953.
(7) DAVIDSON (D.). — *Journ. Chem. Educ.*, **14**, 277-81, 1937.
(8) SCHAEPPI (Y.) et TREADWELL (W. D.). — *Helv. Chim. Acta*, **31**, 577, 1948.
(9) EMELEUS (H. J.) et ANDERSON (J. S.). — Modern aspect of Inorganic Chemistry, Van Nostrand, N, 1938.
(10) MCBAIN (J. W.). — Colloïd Science D. C. HEALTH and Co. Boston, Mass., 1950.
(11) BRITTON (H. T. S.) et DODDS (E. N.). — *Journ. Chem. Soc.* (London), 1543-6, 1933.
(12) DUCLAUX (J.). — Recherches sur les substances colloïdales, Thèse Sci. Paris, 1904.
(13) BAUMAN (W. C.), NACHOD (in. N A C.). — Ion exchange, Acad. Press. 1949.
(14) TANANAEV (I. V.), GLUCHKOVA (M. A.), SEIFER (G. B.). — *Journ. neorg. Khim.*, 1, **1**, 66-68, 1956.
(15) KEGGINS (J. F.) et MILES (F. D.). — *Nature*, **137**, 577, 1936.
(16) VORONTSOV (R. V.). — *Journ. Anal. Khim.*, **8**, 228, 1953.
(17) BONASTRE (J.). — *Ind. Agr. Alim.*, 73, **1**, 21, 1956.

TROISIÈME PARTIE

APPLICATIONS OENOLOGIQUES

1° Les recherches entreprises sur le microdosage du plomb nous ont conduit à étudier l'évolution de cet élément dans le raisin et son comportement au cours de la fermentation alcoolique. Les causes d'enrichissement lors de la conservation du vin sont nombreuses et dépendent de l'installation des chais et de l'état des appareils ; nous avons dans ce qui suit, rapporté les résultats d'essais concernant uniquement l'influence du mode de bouchage des bouteilles.

2° Nous donnons ensuite quelques résultats de traitements de vins par échangeurs de cations en cycle mixte sodico-magnésien, et par le ferrocyanure ferrique.

3° En annexe, quelques bilans de grands vins et des analyses de raisin complètent cette troisième partie.

I. — ÉTUDE DU PLOMB DANS LES VINS

En 1952, un projet de réglementation émanant du Ministère de l'Agriculture de Grande-Bretagne tendait à limiter la teneur en plomb des boissons importées à 0,2 mg par litre. Cette limite semblait à priori très basse, et, après avoir analysé de nombreux échantillons de vin, nous dûmes reconnaître que 60 p. 100 au moins des vins examinés contenaient plus de 0,2 mg/l de ce métal.

Indépendamment d'autres chercheurs, nous avons étudié les causes d'enrichissement en plomb des vins. Nos conclusions sont exposées ci-dessous ; ces travaux, encore inédits, ont été achevés fin 1956. Les conclusions que nous avons tirées sont identiques à celles émises par RANKINE (1) et DE ALMEIDA (2).

Une étude analytique nous a conduit d'abord à comparer les divers procédés de dosage du plomb à l'état de traces, et à mettre au point deux méthodes absolument sûres, qui sont exposées dans la première partie de ce travail.

Nous avons cherché l'origine de ce plomb. Il est à peu près certain que ce métal existe dans la vigne à l'état de traces, où il joue peut-être

un rôle d'oligo-élément ; mais la majeure partie provient d'apports extérieurs. DE ALMEIDA a étudié les causes possibles d'enrichissement en plomb, que lon peut classer comme suit :

a) Apport par les produits anticryptogamiques ; le sulfate de cuivre servant aux traitements en contient des quantités pouvant aller jusqu'à 500 mg par kg.

b) Apport par les produits servant aux traitements du vin : acides organiques, métabisulfite, colles diverses.

c) Apport par le matériel de vinification : le vin, liquide corrosif, peut attaquer les tuyauteries et les récipients insuffisamment protégés : canalisations en laiton (contenant un peu de plomb), soudure des récipients étamés, cuves en béton.

d) Les tuyaux de caoutchouc sont fabriqués en vulcanisant de la gomme brute à laquelle on incorpore une charge minérale : sulfate de baryum, ou... litharge. Une attaque même très légère de tels tuyaux est suffisante pour faire monter la teneur de quelques dixièmes de mg par litre.

e) Le vin en bouteilles peut attaquer les capsules : on admet généralement que des échanges peuvent se produire soit au travers du bouchon, soit entre le bouchon et le goulot, entre le vin et les traces d'humidité contenues entre la capsule et la partie inférieure du bouchon. Un courant de circulation peut ainsi s'établir lorsque des variations de température tendent à faire varier le volume du contenu de la bouteille. Ceci explique les cristaux blancs que l'on trouve parfois sur les bouchons, qui contiennent du plomb, de l'étain, et de l'acide tartrique. Ces cristaux se dissolvent partiellement en passant dans le vin.

Ce mode d'enrichissement est d'ailleurs particulier au plomb. La teneur en fer et en cuivre est définitive lors de la mise en bouteilles, et l'on peut dans une certaine mesure prévoir si le vin conservera sa limpidité ; au contraire, le taux de plomb est essentiellement caractéristique d'une bouteille déterminée et varie dans le temps.

Nous avons cherché à préciser la teneur normale *moyenne* des moûts, sans chercher à différencier le plomb naturel (intérieur du raisin) du plomb apporté par les causes extérieures.

A) TENEUR MOYENNE DES MOUTS INFLUENCE DE LA FERMENTATION

Nous avons suivi l'évolution du plomb au cours du dernier mois de la maturation ; les analyses ont porté sur le vignoble de cinq châteaux réputés de la région. Nous avons obtenu les résultats suivants :

Teneur (moyenne) des raisins de cinq châteaux girondins en 1954 (en mg/l).

Dates de l'analyse	13-9-54	22-9-54	30-9-54	7-10-54
Château 1	0,25	0,25	0,2	0,13
2	0,30	0,30	0,2	0,13
3	0,1	0,10	0,2	0,10
4	0,7	0,10	0,2	0,10
5	0,1	0,20	0,1	0,08

Les derniers traitements anticryptogamiques dataient du 10 août environ.

D'après ces valeurs, on peut penser que la teneur moyenne baisse légèrement vers le moment de la récolte ; les pluies et les brouillards des premiers jours d'octobre entraînent une partie des souillures superficielles.

Les moûts du 7-10-54 ont été vinifiés au laboratoire ; on a comparé la teneur en plomb des vins ainsi obtenus avec celle des vins provenant du chai.

RÉSULTATS

Teneur en plomb (mg/l).

	Vinifié	
	au chai	*au laboratoire*
Château 1	0,10	0,10
2	—	0,06
3	0,16	0,07
4	0,20	0,10
5	0,10	0,08

Si on compare ces valeurs avec les teneurs des moûts initiaux, on voit que la fermentation élimine une certaine quantité de plomb.

Une expérience plus nette a été faite en ajoutant à un moût quelques mg par litre de plomb. Après fermentation, on voit tomber le taux de plomb à moins de 0,1 mg par litre.

Fermentation d'un moût enrichi en plomb.

	Teneur en Pb mg/l
Moût témoin	0,1
Moût enrichi	4
au bout de 12 heures de fermentation	0,3
24 heures	0,3
48 heures	0,18
4 jours	0,1
5 jours	0,1
Moût témoin après 5 jours de fermentation	0,08

Il est probable que par suite de phénomènes de réduction, il se forme suffisamment de H_2S dans le milieu pour précipiter une partie du plomb ; l'acide tartrique peut également intervenir.

Toute manipulation, nécessitant un contact du liquide avec des parois métalliques, peut conduire à un enrichissement : des échantillons ont été prélevés en amont et en aval d'une tuyauterie et analysés ; on a trouvé :

à l'entrée, avant la pompe, 0,15 mg/l,

à la sortie, après la pompe, 0,25 mg/l.

Les points d'enrichissement sont nombreux et difficilement localisables ; des analyses, faites sur les diverses barriques du même vin, montrent des écarts considérables.

	Nombre d'analyses	Teneur maxima	Teneur minima	Moyenne
Château A				
1952	16	0,5	0,08	0,2
1953	16	0,4	0,1	0,2
1954	16	0,8	0,07	0,22
Château B				
1952	9	1	0,2	0,5
1953	11	0,8	0,05	0,13
1954	12	0,7	0	0,1

De même l'enrichissement en bouteilles varie beaucoup d'une bouteille à l'autre : c'est ainsi que nous avons trouvé, sur un vin conservé en bouteilles capsulées depuis 10 ans :

Vin rouge Margaux 1942.

1er échantillon	0,9 mg/l
2e échantillon.....	0,6 mg/l
3e échantillon.....	0,5 mg/l

B) ENRICHISSEMENT AU COURS DU STOCKAGE ESSAI SUR DES SOLUTIONS SYNTHÉTIQUES

Il était intéressant de procéder à des essais de conservation de solutions simples pour étudier l'influence du mode de fermeture des bouteilles.

Pour cela, nous avons préparé la solution suivante :

Acide tartrique	2,5 g
Acide citrique	0,5 g
Acide lactique	2,5 g
Acide acétique	1,5 g
Eau distillée Q. S. pour 1 litre	

Cette solution était répartie en quatre séries de 10 bouteilles de 75 cl, lavées à NO_3H et rincées à l'eau distillée.

Deux séries de bouteilles recevaient une addition d'anhydride sulfureux (450 mg/litre).

Les bouteilles étaient bouchées avec des bouchons de liège de 37 mm ; deux séries de bouteilles portaient des bouchons paraffinés de sorte qu'on avait les séries suivantes :

1. — Sol. d'acides organiques *avec* SO_2 bouché liège *paraffiné.*
2. — Sol. d'acides organiques *sans* SO_2 bouché liège *paraffiné.*
3. — Sol. d'acides organiques *avec* SO_2 bouché liège *non paraffiné.*
4. — Sol. d'acides organiques *sans* SO^2 bouché liège *non paraffiné.*

Les bouteilles étaient ensuite capsulées et conservées en cave.

Les résultats analytiques sont les suivants :

Influence du mode d'obturation des bouteilles sur l'enrichissement en plomb (résultats en mg/l).

Dates	15-9-54	31-3-55	6-9-55	9-4-56	21-11-56	29-3-58
Série 1.....	0,02	0,04	0,04	0,04	0,03	0,05
2.....	0,02	0,02	0,03	0,03	0,11	0,12
3.....	0,02	0-08	0,05	0,05	0,05	0,27
4.....	0,02	0,05	0,05	0,05	0,01	0,15

On peut remarquer que, après trois ans et demi de conservation, les bouteilles contenant le moins de plomb sont celles fermées par des bouchons paraffinés.

Les teneurs inférieures à 0,1 mg/l sont purement indicatives car on atteint la limite de sensibilité des méthodes de dosage.

Des échantillons, conservés au laboratoire et soumis à des variations de température de plus grande amplitude, ont donné des résultats nets :

Dates	9. 4. 56	21. 11. 56	29. 3. 58
Non capsulé.....	0,02	0,02	0,02
Capsulé matière plastique.....	0,02	0	0,03
Capsulé plomb.....	0,02	0,1	0,5

Conclusions.

Les enrichissements par le plomb posent beaucoup de problèmes car, pour éviter tout apport après la fermentation, il faudrait reconsidérer tout le matériel de chai traditionnel. En effet, seuls les plastiques semblent ne céder aucune trace de plomb.

D'autre part, les enrichissements au cours du vieillissement en bouteilles depuis longtemps capsulées ne sont pas négligeables, et ne peuvent être évités avec les procédés classiques d'obturation ; les deux derniers essais montrent que l'attaque des bouteilles est nulle.

II. — EMPLOI DES ÉCHANGEURS D'IONS POUR LE TRAITEMENT DES VINS

A) RÉSINES ÉCHANGEUSES D'IONS

Le traitement des vins par les échangeures d'ions a fait l'objet d'un grand nombre d'études depuis 1950, surtout en Italie. Les recherches ont porté en particulier sur les points suivants :

— Désacidification.
— Élimination d'une partie du potassium et du calcium.
— Élimination de métaux lourds, fer et cuivre principalement.

La législation française interdit l'emploi de ces produits pour le traitement des vins. Les essais de laboratoire que nous avons effectués ne tendent qu'à montrer les aspects théoriques du problème, sans qu'il soit question de conseiller leur utilisation.

1. — Formes possibles du traitement.

Nous avons publié le compte rendu d'expériences (3) dans lesquelles des vins identiques étaient traités :

— par des échangeurs de cations en cycle sodique,
— par des échangeurs de cations en cycle acide, puis par des échangeurs d'anions.

Les conclusions de ces essais sont les suivantes : le premier procédé est parfaitement efficace vis-à-vis des précipitations de tartre, et les caractères organoleptiques du vin ne sont guère modifiés.

L'emploi simultané des deux sortes d'échangeurs modifie l'équilibre acides-bases du vin ; ces modifications font apparaître à l'analyse des caractéristiques voisines de celles de vins légèrement mouillés. Par ailleurs, le bouquet est sensiblement altéré.

Dans les deux cas, le cuivre est bien éliminé ; par contre le fer est enlevé de manière irrégulière suivant l'état d'aération du vin.

2. — Non efficacité des échangeurs carboxyliques.

Nous citerons simplement deux expériences pour démontrer l'inutilité des échangeurs carboxyliques. La loi d'action de masses nous avait montré :

— que sous forme acide, on ne peut en attendre aucune réaction,

— que sous forme sodique, ils produisent une forte désacidification.

La résine employée était l'AMBERLITE IRC 50, à raison de 10 g par litre d'un vin blanc de pH 3 enrichi en métaux lourds.

Action de la résine AMBERLITE *IRC 50 sous forme acide sur le vin.*

	Vin témoin	par agitation durant 60 mn	Vin traité en colonne vitesse de passage 1 litre en 60'	par agitation durant 20 h
PH	3,0	3,0	3,0	3,0
Ac. totale méq/l	101	101	100	100
Métaux totaux méq/l	38	38	38	38
K méq/l	19	19	19	18,5
Na méq/l	7·5	7,3	7,3	7,3
Fe mg/l	10	10	10	10
Cu mg/l	3	3	2,5	2,5
Zn mg/l	10	10	10	10
Pb mg/l	0,8	0,7	0,8	0,8

Même après 20 heures de contact, l'échange est pratiquement nul.

EMPLOI SOUS FORME SODIQUE

Le but de cette manipulation est de montrer :

a) Que la régénération par le chlorure de sodium est incomplète.

b) Que la résine R·COONa est décomposée par les ions H^+ de l'eau.

On a montré que, pour régénérer un échangeur de cations carboxylique, il faut employer un sel de sodium dont le pH en solution est supérieur à 5,7, par exemple le bicarbonate. D'autre part, pour éviter l'hydrolyse, on doit laver avec une solution de NaCl, sinon un lavage à l'eau distillée donne de nouveau l'échangeur R-COOH.

L'essai 1 correspond à un échangeur régénéré par le bicarbonate et rincé ensuite à l'eau jusqu'à élimination des ions Cl^- (en employant le minimum d'eau).

L'essai 2 correspond à un échangeur traité de manière identique, mais rincé longuement à l'eau.

L'essai 3 correspond à un échangeur régénéré avec 10 fois la quantité de NaCl théoriquement nécessaire.

L'examen des résultats montre que les échanges qui se produisent sont presque uniquement du type :

$$R\cdot COONa + H^+ \rightarrow R\cdot COOH + Na^+$$

l'échange de bases n'intervenant que pour 8 p. 100 environ de l'échange total.

Vin blanc, traité par résine carboxylique, à raison de 20 g/l. Conditions variées de lavage et de régénération de l'échangeur.

	Vin témoin	Vin traité		
		Essai 1	Essai 2	Essai 3
PH	3,15	5	4,5	3,7
Acidité totale méq/l	100	25	40	76
K méq/l	19,4	16,6	17,9	16,9
Na méq/l	6	86,5	70,4	34,5
Ca méq/l	4	2,5	3,2	3,5
Mg méq/l	8	5,4	5,4	6,4
$\Sigma (H^+ + Me^+)$	137,8	136,3	136,9	136,9

Nous voyons, d'après ces essais, que les échangeurs carboxyliques n'ont aucun intérêt pour le traitement des vins. Bien plus, leur seul mode d'action est la désacidification, ce qui est contraire à la législation. Cette technique de désacidification ne présente même aucun intérêt pour le fraudeur éventuel ; pour lui, il est beaucoup plus simple d'ajouter directement au vin un certain poids de carbonate de sodium !

La régénération saline mixte.

On a reproché au cycle sodique d'appauvrir le vin en ions alcalino-terreux tels que le magnésium, et d'introduire dans le vin une quantité trop importante de sodium. Pour y remédier, divers auteurs ont cherché à ajouter à l'échangeur une faible quantité d'ions Mg qui devrait, en passant dans le vin, diminuer sensiblement les inconvénients précités.

Pour que l'influence du magnésium soit appréciable, il faut que l'échange se produise. Or, pour qu'il en soit ainsi, il est nécessaire que l'activité des ions bivalents dans la résine soit plus grande que dans le vin, ce qui doit s'écrire :

$$\left(\frac{\gamma_{Mg} C_{Mg}}{[\gamma_K C_K]^2}\right)_R > \left(\frac{\gamma_{Mg} C_{Mg}}{[\gamma_K C_K]^2}\right)_S$$

Pratiquement, cette inégalité est vérifiée lorsque la concentration en magnésium dans l'échangeur est à peu près égale à la concentration en sodium ; en d'autres termes, il faut employer un *cycle salin mixte* tel que celui que nous avons défini précédemment ; l'utilisation d'un échangeur contenant 1,5 à 2 p. 100 de Mg^{++} ne peut produire aucun effet.

Nous avons traité le même vin par un échangeur DOWEX 50 sous différentes formes salines :

— sodique pur,
— magnésienne pure,
— mixte à 50 p. 100,

— *sodico-magnésienne double* : la quantité d'échangeur à utiliser était divisée en deux parties égales ; l'une est sous forme sodique, l'autre sous forme magnésienne ; le vin traverse successivement les deux lots.

Essais comparatifs de divers modes de régénération sur un vin blanc traité par une colonne d'échangeur sulfoné régénéré en cycle salin.

Composition du vin traité en fonction de la quantité de résine employée.

	Témoin	Cycle sodique simple			Cycle mixte à 5 %			Cycle magnésien simple			Cycle double après traitement Mg
		40 g/l	20 g/l	10 g/l	40 g/l	20 g/l	10 g/l	40 g/l	20 g/l	10 g/l	10 g/l
pH	3,3	3,3	3,3	3,3	3,3	3,3	3,3	3,3	3,3	3,3	3,3
Ac. tot. méq/l	93,5	—	—	—	—	—	—	=	=	92	92
K	24,6	0,85	4,1	14,1	1,1	10,8	16,3	6,15	10,5	15,4	16,1
Na	2,9	40,6	39,2	26,2	36,1	28,2	19,6	2,0	2,2	2,8	13,9
Ca	8,4	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Mg	6,6	0	0	traces	4,5	—	8	—	—	23,4	11
Fe	15	—	7	7	—	8	10	—	—	8	7

Ces quatre traitements ont une influence à peu près semblable sur le taux de potassium.

Le cycle salin double est cependant celui qui perturbe le moins le rapport $\frac{\text{alcalins}}{\text{alcalino-terreux}}$. Les vins ainsi traités ne précipitent plus au froid.

B) UTILISATION DU FERROCYANURE FERRIQUE

L'utilisation des échangeurs de cations permet parfois une élimination assez bonne du fer et du cuivre des vins, au prix cependant d'une modification complète du taux des autres cations. Cette élimination n'est pas toujours bonne ; pour le fer en particulier, elle dépend de l'état d'aération du vin.

Au point de vue stabilité, le vin est beaucoup plus tolérant vis-à-vis du fer que du cuivre : 0,2 mg de ce métal suffisent à provoquer la casse cuivreuse si redoutée dans les vins blancs. D'autre part, les cations tels que le plomb, le zinc, sont assez peu touchés par les échangeurs d'ions.

De nombreux travaux ont été effectués pour élucider les mécanismes qui conduisent aux précipitations connues sous le nom de « Casses » et établir la nature des composés du fer et du cuivre, ainsi que les réactifs susceptibles d'éliminer ces métaux dans des conditions satisfaisantes, tant du point de vue pratique que du point de vue bromatologique.

Parmi tous les composés utilisés, seul le ferrocyanure de potassium, qui a été temporairement autorisé en France est d'un emploi pratique, moyennant certaines précautions bien connues des techniciens.

On connaît le rôle du cuivre, qui agit comme catalyseur de la casse ferrique ; il est souhaitable que cet ion soit absent du vin. Par ailleurs, un procédé permettant l'élimination des autres métaux lourds (plomb en particulier) présenterait un intérêt capital. Or, des essais nous l'ont démontré, la précipitation du plomb par le ferrocyanure n'est possible que lorsque la totalité du fer et du cuivre sont déjà éliminés. Ceci conduirait pratiquement à ajouter aux vins du ferrocyanure en excès, ce qui n'est évidemment pas compatible avec l'hygiène et la législation.

Nous avons étudié déjà l'utilisation du ferrocyanure ferrique comme échangeur d'ions lourds. Nous avons vu que ce sel permet d'éliminer la majeure partie, sinon la totalité, du plomb et du cuivre d'une solution. Son emploi pour le traitement des vins peut se justifier par les arguments suivants :

a) Bonne efficacité vis-à-vis des métaux lourds.

b) Insolubilité totale au pH du vin ; en particulier, le passage de composés cyanés dans le vin est pratiquement impossible.

c) Préparé dans de bonnes conditions et conservé à sec, il est stable dans le temps.

d) Il peut être incorporé à un agent filtrant tel que la célite, pour réaliser un produit utilisable comme un filtre doué de propriétés d'échange d'ions lourds, et sélectif de ces ions.

Signalons que certains produits, à base de ferrocyanures lourds, ont été proposés aux États-Unis ; ils présentent une bonne efficacité, mais ont l'inconvénient majeur de manquer de stabilité dans le temps.

Exemples de résultats obtenus

Parmi les très nombreux essais pratiques effectués sur des vins de différentes natures, enrichis ou non en métaux lourds, nous ne citerons que deux essais.

a) Comparaison de différentes qualités de « Célites ».

Le vin étudié, enrichi en métaux lourds, était traité :

— d'une part au ferrocyanure de potassium, en quantité déterminée expérimentalement par l'essai préalable, suffisamment connu des œnologues et qu'il est inutile de décrire,

— d'autre part par un excès de ferrocyanure de potassium,

— enfin, par le ferrocyanure ferrique associé à différentes qualités de célite.

Les résultats rapportés dans le tableau montrent que la nature de la célite n'a aucune influence sur l'efficacité du dispositif. On constate d'autre part que la quantité de ferrocyanure à utiliser pour enlever tous les métaux lourds conduit à introduire un excès de ce réactif dans le vin. C'est à dessein que, dans l'exemple choisi, on a utilisé un vin contenant peu de fer par rapport aux autres métaux lourds.

Témoin	Traité au ferro K traitement correct	Traité au ferro K en excès	Traité au ferro Fe célite 512	Traité au ferro Fe hyflo super	Traité au ferro Fe filter cel
Fer 5.....	trace	0	11	9	11
Cuivre 4	0,6	0	0	0	0
Plomb 2,5.....	2	0	0	0	0
Zinc 2,5.....	1	0	0	trace	0
Manganèse 1,5.....	1,5	0	1,5	1,5	0,5
Aluminium 10.....	10	10	10	10	10

Nous avons signalé précédemment que le lavage des filtres de « complexe » avec une solution acide évite tout enrichissement en fer, et favorise même l'élimination de ce métal.

b) **Comparaison avec un échangeur de cations.**

On a étudié l'élimination des métaux lourds dans un vin au moyen
— de la quantité déterminée de ferrocyanure de potassium,
— du ferrocyanure ferrique associé au Filter-Cel (10 g/l associés à 5.10^{-3} M de ferrocyanure ferrique + une quantité non déterminée de fer adsorbé),
— de l'échangeur DOWEX 50 en cycle sodique, employé à raison de 10 g/l.

Nous constatons que seul le traitement au ferro-ferrique permet une bonne élimination des métaux lourds (voir tableau II).

	Témoin	Traité ferro K	Traité ferro Fe	Traité DOWEX 50
Fer.....	10	3	14	6
Cuivre.....	3	0,2	0	2
Zinc.....	10	10	4,5	10
Plomb.....	0,8	0,6	0,1	0,7

Son utilisation rationnelle pourrait se faire dans des filtres à plaques, l'élimination des métaux lourds se faisant ainsi au cours d'une simple opération de filtration.

III. — DOCUMENTS ANALYTIQUES

A) Bilans de cations effectués sur quelques vins de provenance authentique.

Bilans des cations sur divers grands vins mis en bouteilles au château.

Provenance et année	Cendres g/l	Alcalinité cendres méq/l	Cations totaux méq/l	K méq/l	Na méq/l	Alcalino-terreux méq/l	Fe mg/l	Cu mg/l	Pb mg/l	Zn mg/l	Mn mg/l	Al mg/l
Vins blancs												
Sauternes 1948	3,4	23	45	30	2	Ca 5,5 Mg 9	5,5	0,3	1,5	1,1	1,4	—
» 1936	3,9	—	50	39	2	8	5	0,2	2,6	0,6	3	—
» 1944	—	45	78,9	51,3	7,6	19,5	0	0,4	0,0	2,2	2,2	—
» 1950	5,2	22	65	54	2,1	7,6	11	1,5	1,5	0,1	2,5	—
» 1953	4,9	21	62	51	2	7	5	1	0,8	0,8	3	—
Sauternes 1949	—	50	59	40	3,4	14	0	0,5	0,2	2,3	3,0	—
Vins rouges												
Médoc 1951	—	—	43	28,7	2,2	11	7	0,7	0,15	1,6	0,8	8
» 1951	—	—	43	28,2	3,5	10,4	5	0,4	0,2	1	1	4
» 1951	—	—	41	28,7	1,7	10	1	0	0,3	0,7	0,6	6
» 1948	2,3	—	35	28,2	2,8	4,5	6	0,6	0,2	6	0,9	1,5
» 1950	2,7	21	33	27,4	2,1	3	5	0,1	4,6	2,3	1,5	—
» 1951	—	—	44	28,2	2,8	9	3	0,3	0,15	1,2	0,6	7
St-Émilion 1950	—	—	44	32,8	2,6	8,2	14	0,6	0,2	3,5	0,9	3
» 1954	—	—	—	29,7	2,4	7	15	2	0,1	8	0,6	3,5
« 1948	—	—	51	28,2	2,8	5	4	0,8	0,1	0,5	0,9	1,5
» 1926	3,0	16	41	29	4	6	11,5	1,5	0,6	4	—	—
» 1951	3,5	12,5	47	33	6	6	11,5	0,2	1,5	1,5	1,7	—
» 1926	3,7	14	49	40	5	4	11,5	0,1	0,4	1,1	—	—
Médoc 1952	—	—	38	27	3	5	9,5	0,3	0,3	3,6	0,6	—
» 1954	2,45	20	35	25	1,6	10	14	0,1	0	2,6	—	—
1° Côtes 1954	3,0	25	39	30,5	2,6	Ca 4 Mg 4	7,5	0,2	0	2,1	0,9	—
» 1952	2,20	16,5	34	23	2	Ca 5 Mg 6	13	0,5	0,9	0,85	1,35	—

B) Évolution des matières minérales du raisin au cours de la maturation.

Maturation 1957. Évolution des matières minérales en fonction du temps.

Château L Médoc
Résultats rapportés à 1 litre de jus
Cépage CABERNET-SAUVIGNON

Dates		12-8-57	20-8-57	30-8-57	10-9-57	20-9-57	30-9-57	7-10-57
Cendres	g/l	4,1	3,85	3,22	4,20	4,50	3,95	5,2
Alcalinité des cendres	méq/l	46	41	39	47	66	47	33
Cations totaux	méq/l	421	424	282	229	204	194	204
Acidité totale	méq/l	370	370	226	170	140	126	138
Différence : métaux	méq/l	51	54	56	59	64	68	66
Potassium	méq/l	35,9	38,4	39,2	45,0	49,2	53	51
Sodium	méq/l	1,1	1,1	1	1,0	1,0	1	1,2
Alcalino-terreux	méq/l	13	14	15	12	12	13	12
Somme	méq/l	50,0	53,5	55,2	58,0	62,2	67	64,2
Cuivre	mg/l	3,0	3,1	3,1	2,8	1,9	1,8	0,5
Zinc	mg/l	2,2	2	1,1	1,4	—	1,5	0,9
Manganèse	mg/l	0,9	1,5	—	—	—	—	—
Plomb	mg/l	0,3	0,4	1	0,8	0,2	0,2	0,3

Maturation 1957. Évolution des matières minérales en fonction du temps.

Château L. Médoc
Résultats rapportés à 1 litre de jus
Cépage MERLOT

Dates		12-8-57	20-8-57	30-8-57	10-9-57	20-9-57	30-9-57	7-10-57
Cendres	g/l	3,7	4,13	3,54	4,80	3,50	4,10	5,4
Alcalanité des cendres	méq/l	49	41	45	51	46	42	30
Cations totaux	méq/l	494	394	270	220	200	184	184
Acidité totale	méq/l	440	334	210	156	136	120	120
Différence : métaux	méq/l	52	60	60	64	64	64	64
Potassium	méq/l	34,7	36,6	35,9	46,2	53	53	46,1
Sodium	méq/l	1,1	1,45	1,4	1,1	1,25	1	1,8
Alcalino-terreux	méq/l	15	20	21	15	11	10	14
Somme	méq/l	50,8	58,05	58,3	62,3	65,25	64	61,9
Cuivre	mg/l	3,6	2,8	3	1,5	3,1	1,2	—
Zinc	mg/l	0,9	2	1,3	1,5	2	0,8	—
Manganèse	mg/l	—	1,3	2,3	—	—	—	—
Plomb	mg/l	—	0,6	0,4	0,4	0,2	0,5	—

RÉSUMÉ ET CONCLUSIONS

Les méthodes analytiques qui constituent la première partie de ce travail ont été mises au point en vue de l'examen des vins, mais elles peuvent être parfaitement utilisées pour l'analyse chimique générale. Pour concilier dans la mesure du possible précision et rapidité, on a été amené à travailler à l'échelle semi-micro, ce qui diminue les inconvénients relatifs à la minéralisation d'échantillons trop importants. Il fallait donc faire appel à des techniques très sensibles de détection ou à des procédés

physiques. L'ensemble de méthodes que nous présentons a permis d'établir la documentation rassemblée en annexe.

La deuxième partie traite de l'action des échangeurs de cations sur les solutions tamponnées d'ions alcalins et alcalino-terreux. La partie théorique montre que l'on peut, de façon simple, prévoir le comportement d'un échangeur cationique en fonction de la nature du groupement actif; les résultats ont été appliqués au traitement de vins en vue d'éliminer certains cations nuisibles à leur bonne tenue.

Nous exposons quelques-uns des arguments que l'on peut opposer à l'emploi d'échangeurs d'anions, et indiquons les raisons qui nous ont conduit à mettre au point un nouveau mode de régénération saline.

Nous avons tenté de déterminer les produits de solubilité de divers ferrocyanures de métaux lourds. A cette occasion, nous avons établi une nouvelle méthode indirecte pour la mesure de cette constante. Si les résultats obtenus sont satisfaisants lorsqu'on travaille sur des espèces chimiques définies, on ne peut obtenir dans le cas des ferrocyanures qu'un ordre de grandeur, en raison de leur nature.

On a pu pratiquement préparer une composition à base de ferrocyanure ferrique, qui présente des propriétés d'adsorption et d'échange d'ions. Son principal intérêt est sa sélectivité absolue vis-à-vis des métaux lourds, et il semble qu'on pourrait envisager son emploi en œnologie.

La troisième partie résume les applications œnologiques de ce qui précède. Nous avons, en particulier, étudié les causes d'enrichissement en plomb des vins. Ces causes sont multiples et certainement difficiles à combattre de manière satisfaisante.

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

(1) Rankine (B. C.). — *J. Sci. Food Agr.*, **6**, 576-79, 1955.
(2) Almeida (H. de). — *Inst. Vinho Porto*, **8**, 11-28 D, 1947.
(3) Ribereau-Gayon (J.), Peynaud (E.), Portal (E.), Bonastre (J.) et Sudraud (P.). — *Ind. Agr. et Alim.*, **73**, 85-91 et 171-77, 1956.

TABLE DES MATIÈRES

MÉMOIRES ORIGINAUX

Petit (L.). — Recherches sur la réaction de Maillard..... 5
Kuzdzal-Savoie (S.). — Influence de la race des vaches laitières sur la composition de la matière grasse du lait et la qualité du beurre 35
Girard (H.) et **de Charon (E.).** — Caractérisation du taux de fermentation du raffinose par les levures par chromatographie sur papier 55
Flanzy (M.) et **Bouzigues (L.).** — Pectines et Méthanol dans les moûts de raisin et les vins..... 59
Cordonnier (R.) et **Bizeau (C.).** — Dosage de l'acide malique dans les moûts et les vins 69
Flanzy (M.). — Elaboration des vins spiritueux doux (vins doux naturels). Réglementation et alcoolisation 81
Rives (M.). — Note sur la méthode de l'échelle hédonique pour mesurer les préférences gustatives..... 101
Flanzy (J.) et **Flanzy (M.).** — Note sur la valeur de l'huile de pépins de raisin en acides gras essentiels 107
Raibaud (P.), **Herren (R.)**, **Mocquot (G.)** et **Kosikowski (F. V.).** — Mise en évidence dans certains fromages de systèmes enzymatiques actifs sur la Tyrosine..... 117
Kuzdzal-Savoie (S.) et **Kuzdzal (W.).** — La recherche du lait de vache ajouté au lait de chèvre. Application au cas du fromage 131
Flanzy (M.) et **Benard (P.).** — Recherches sur l'action fongicide de la mycostatine 145
Sainclivier (M.). — Etude des conditions d'emploi de la méthode Smeets pour le dosage du calcium ionisé dans un ultra-filtrat de lait 155
Flanzy (M.) et **André (P.).** — Désulfitation des jus de raisin..... 171
Kuzdzal-Savoie (S.). — Influence de la race des vaches laitières sur la composition de la matière grasse du lait 193
Dupuy (P.). — L'inhibition par l'acide sulfureux de l'oxydation de l'éthanol par *acetobacter rancens*.....233 et 337
Flanzy (M.). — Recherches sur la vinification des vins doux naturels 285
Galzy (P.). — Etude des possibilités d'utilisation en technologie d'une levure à déficience respiratoire 321
Bonastre (J.). — Contribution à l'étude des matières minérales dans les produits végétaux — application au vin 377

CHRONIQUE DES LIVRES

Ribereau-Gayon (**J.**) et **Peynaud** (**E.**). — Analyse et contrôle des vins (2eme édition 1958) 113
Petit (**L.**). — Les méthodes analytiques des céréales. Farines et autres dérivés 223
Cook (**A. H.**). — The chemistry and biology of yeasts 224

Le Directeur-Gérant ; B. LACLAVIÈRE.

Imprimerie BUSSIÈRE à Saint-Amand (Cher), France. — 18-2-1960.
Dépôt légal: 1er trimestre 1960 *N° d'impression: 723*